

eISSN: 2667-8292

Turk Vet J, Vol : 1 (2), 2019



Turk Vet J

TURKISH
VETERINARY
JOURNAL

Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Sivas Cumhuriyet University

Aims and Scope

Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J), aims to publish articles (original research article, short communication, letters to editor, review article, and case report) on Veterinary basic sciences, clinic or preclinical sciences, zootechnics, animal nutrition, food hygiene and technology both in Turkish or English. Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J) is an international, double peer reviewing scientific journal that publishes by Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine. Manuscript will be published should not be published before in elsewhere and should be based on the research (except review articles). Turk Vet J is published three in a year and an open access scientific journal. Special issues may be published by the decision of the journal administration. The journal accepts English or Turkish manuscripts. Turk Vet J doesn't ask fee for the processing the article.

Amaç ve Kapsam

Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J), Türkçe veya İngilizce olarak, temel bilimler, klinik ve klinik öncesi bilimler, zootekni, hayvan besleme ile gıda hijyeni ve teknoloji alanlarında makaleleri (araştırma makalesi, kısa bildiri, editöre mektup, derleme ve vaka takdimi türlerinde) yayımlamayı amaçlar. Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J), Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi tarafından yayımlanan, uluslararası, çift hakemli bilimsel bir dergidir. Dergiye, ulusal ya da uluslararası ilgi ve uygulama içiren ve yeni bilgiler barındıran makaleler sunulabilir. Yayımlanacak makalelerin, daha önceden yayımlanmamış ve araştırma sonuçlarına dayalı olması gerekmektedir (derleme makaleleri hariç). Turk Vet J açık erişim sağlamak üzere yılda üç defa online olarak yayınlanır. Dergi yönetiminin kararları doğrultusunda özel ya da ek sayılar yayımlanabilir. Turk Vet J Türkçe ve İngilizce yayınları kabul eder. Turk Vet J makale işlem ücreti (değerlendirme ücreti veya basım ücreti) ve makalelere erişim için herhangi bir ücret talep etmez.

Owner / Sahibi

Prof. Dr. Kürşat ALTAY

Editors / Editörler

Prof. Dr. Alparslan COŞKUN (Editor in Chief / Baş Editör)

Dr. Öğ. Üyesi Hakan İŞİDAN (Managing Editor / Sorumlu Yazı İşleri Müdürü)

Dr. Öğ. Üyesi Alper KOÇYİĞİT (Editor / Editör)

Editorial Board / Editörler Kurulu

Dr. Öğ. Üyesi Gökçe ÖZDEMİR

Dr. Öğ. Üyesi Hakan MURAT

Dr. Öğ. Üyesi Mustafa KOÇKAYA

Dr. Öğ. Üyesi Recep KALIN

Dr. Öğ. Üyesi Seyda ŞAHİN

+90 346 219 1812

<http://dergipark.gov.tr/turkvetj>, turkvetj@cumhuriyet.edu.tr,

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 58140, Sivas; Türkiye

eISSN: 2667-8292



Prof. Dr. Fuat SEZGIN anısına...
In memory of Prof. Dr. Fuat SEZGIN...

CONTENTS / İÇİNDEKİLER

Türk Vet J 1(2)

Research Article / Araştırma Makalesi

Modifiye U-synch Protokolü ile Mevsim Dışı Senkronize Edilen Akkaraman Kangal Irkı Prepubertal Kuzu ve Primipar Koyunlara GnRH ve hCG Uygulamalarının Fertilite Üzerine Etkisi 60-68

The Effects of GnRH and hCG Applications on Fertility in Akkaraman Kangal Prepubertal Lambs and Primiparous Sheep with Synchronized Modified U-synch Protocol and out of Breeding Season

Abdurrahman Takcı

Sivas ve İlçelerindeki Neonatal İshalli Buzağılarda E. coli, Cryptosporidium, Clostridium perfringens, Rotavirüs ve Coronavirüs Prevalansı 69-73

Prevalence of E. coli, Cryptosporidium, Clostridium perfringens, Rotavirus and Coronavirus in Neonatal Calves with Diarrhea in Sivas

Canan Caner Kuliğ, Alparlan Coşkun *

Review / Derleme

Tick-borne Pathogens in Small Ruminants in Turkey: A Systematic Review 74-83

Türkiye'deki Küçük Ruminantlarda Kene ile Bulaşan Patojenler: Sistemik Bir Derleme

Mehmet Fatih Aydın*, Nazir Dumanlı

Fare, Sıçan ve Tavşanların Viral Hastalıkları 84-89

Viral Diseases of Mice, Rats and Rabbits

Bahadır Müftüoğlu*, Harun Albayrak

Virüslerin Reverz Genetiği 90-100

Reverse Genetics of Viruses

Hasan Abaylı

Case Report / Vaka Takdimi

Metastatic Osteosarcoma in a Kangal Breed Dog 101-105

Kangal Irkı Bir Köpekte Metastatik Osteosarkom

Emin Karakurt*, Enver Beytut, Başak Kurt, Hilmi Nuhoğlu, Serpil Dağ, Uğur Yıldız

Surgical Correction of Unilateral Congenital Cryptophthalmos in a Lutino Cockatiel (Nymphicus hollandicus) 106-109

Bir Sultan Papağanında (Nymphicus hollandicus) Tek Taraflı Kongenital Cryptophthalmosun Cerrahi Düzeltimesi Olgusu

Aynur Demir



Modifiye U-synch Protokolü ile Mevsim Dışı Senkronize Edilen Akkaraman Kangalırkı Prepubertal Kuzu ve Primipar Koyunlara GnRH ve hCG Uygulamalarının Fertilite Üzerine Etkisi

Abdurrahman TAKCI

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji A.D. 58140 Kampüsü, Sivas, Türkiye

*Corresponding Author's E-Mail: abdurrahmantakci@cumhuriyet.edu.tr

Özet

Koyunlar mevsimsel poliöstrik hayvanlardır. Yerli gen kaynağımız olan Akkaraman-Kangalırkı koyunlar da yıl içinde sadece üreme sezonunda (sonbahar aylarında) seksüel aktivite göstermektedir. Bundan dolayı üreme sezonu dışında (anöstrüste) gebelik elde etmek için farklı seksüel uyarımlar yapılması gerekmektedir. Bu amaçla mevcut çalışma her grubun 15 baş prepubertal kuzu (10-14 aylık) ve 10 baş primipar koyun (postpartum 55-70.günlerinde olan) ihtiva ettiği üç grup ile derin anöstrüs döneminde (Mayıs-Haziran) olan hayvanlarda yürütülmüştür. Bütün gruplara 0. gün 100 µg gonadorelin diasetat tetrahidrat kas içi enjeksiyonu ile birlikte 20 mg flurogestan asetat içeren sponj 7 gün süreyle vaginada tutulmuş ve sponj çıkarıldığı gün 131,5 µg kloprostenol sodyum ve 600 IU eCG kas içi enjeksiyonları yapılmıştır. Sponj çıkarıldıktan 56 saat sonra (10. gün); Grup 1'deki hayvanlara 100 µg gonadorelin diasetat tetrahidrat (GnRH), Grup 2'deki 600 IU hCG enjeksiyonu yapılırken, Grup 3 (Kontrol)'deki hayvanlara 2 ml serum fizyolojik enjeksiyonlarını takiben koç katımı yapıldı ve koçlar 5 gün boyunca (10-15. gün) koyunlarla birlikte kaldı. Gruplar arasında östrüs gösterme, gebe kalma oranları ve eşit günlerde progesteron seviyeleri değerlendirilmiş olup gruplar arasında bu parametreler yönünden oluşan fark istatistiki yönden anlamlı bulunmadı. Modifiye U-synch yöntemlerinin prepubertal toklu ve primipar koyunlarda reproduktif etkinliği benzer bulundu. Sonuç olarak Akkaraman Kangalırkı prepubertal toklu ve primipar koyunlarda modifiye U-synch yöntemleri ile anöstrüste gebelik elde edilebileceği belirlenmiştir.

Received 19 July 2019
Received in revised form 30 July 2019
Accepted 4 August 2019

Anahtar kelimeler:

Akkaraman, anöstrüs, kangal, prepubertal, koyun.

Cite this article: Takcı A (2019) Modifiye U-synch Protokolü ile Mevsim Dışı Senkronize Edilen Akkaraman Kangalırkı Prepubertal Kuzu ve Primipar Koyunlara GnRH ve hCG Uygulamalarının Fertilite Üzerine Etkisi. Turk Vet J, 1(2):60-68.

The Effects of GnRH and hCG Applications on Fertility in Akkaraman Kangalırkı Prepubertal Lambs and Primiparous Sheep with Synchronized Modified U-synch Protocol and out of Breeding Season

Abstract

Sheep are seasonally polyestrous. Our native genetic source Akkaraman-Kangalırkı breed sheep show sexual activity only in breeding season (months of fall) through year too. Different induction methods are needed to produce lamb out of breeding season). For this purpose, the study conducted on 3 groups which involve 15 prepubertal ewe lamb (10-14 months of age) and 10 primiparous ewe (55-70 days of postpartum) in deep anestrous (may-june). Each group was recieved 100 µg gonadorelin diacetate tetrahydrate (GnRH) together with progesterone including sponge (20 mg flugeston acetate). Sponge was out 7 days (7th Day) later following 131,5 µg PGF2α and 600 IU eCG injection. 100 µg gonadorelin diacetate tetrahydrate (GnRH), 600 IU hCG and 2 ml sterile saline solution was injected to group 1, 2 and 3 respectively at the 56th hour following sponge out. Ram were introduced to the groups for 5 days after injection (between 10-15th days). Progesterone levels, Estrous and pregnancy rate were evaluated. Significant diffirences was not observed between groups. Reproductive efficiency of the modified U-synch method found to be smilar in prepubertal ewe lambs and primiparous ewes. In conclusion, it was determined that a reasonable pregnancy rate can be achieved with modified U-synch method in Akkaraman-Kangalırkı prepubertal ewe lambs and primiparous ewes.

Key words: Akkaraman, anestrus, kangal, prepubertal, sheep.

Giriş

Koyunlar mevsime bağlı üreme özelliğine sahiptirler. Üreme sezonunda östrüs siklusunun ardışık şekilde tekrar etmesi sebebiyle mevsimsel poliöstrik hayvanlar olarak nitelenir. Mevsime bağlı üreme özelliği doğal bir kontraseptif (gebelik önleyici) olarak karşımıza

çıkılmaktadır. Doğumların belirli bir zaman diliminde olması kuzu ve süt üretimlerinin de yılın bir döneminde yoğunlaşmasına neden olmaktadır. (Gómez-Brunet ve ark., 2008; Bartlewski ve ark., 2011; Abecia ve ark., 2012; Weems ve ark., 2015; Pampori ve ark., 2018).

Koyunlarda reproduktif etkinliğinin değerlendirilmesi koyunların yaşamları boyunca sahip oldukları kuzu verimlerine bakılarak yapılmaktadır. İlk kuzulama yaşı ve kuzulamalar arasındaki zamanın azaltılması halinde reproduktif verimin arttığı bilinmektedir. Sezon dışında farklı uygulamalar ile ovulasyonlar sağlandığı takdirde üreme sezonu ve pubertasa ulaşma yaşı ayarlanabilmektedir (Lewis ve ark., 1996).

Koyunlar 7-10 aylık yaşta yetişkin ağırlığının %50-70'ine ulaştığında pubertasa erişirler. Kuzularda pubertaya geçişte mevsim belirleyici rol oynamaktadır. Beslenme ve vücut ağırlığı gibi faktörler yeterli olsa dahi sezona ulaşmadan kuzuların pubertal aktivite göstermeleri mümkün değildir. Bu nedenle aşım sezonu dışında pubertasa geçiş için gerekli olgunluğa ulaşan kuzular ancak takip eden aşım sezonunda pubertasa ulaşabilmektedir (Valasi ve ark., 2012). Doğumdan sonraki ilk yıl içerisinde pubertasa ulaşarak gebe kalan kuzular yetişkin olduklarında daha yüksek reproduktif performans sergilemektedir. Bu nedenle reproduktif olgunluğa erişmiş ancak mevsimsel olarak pubertasa erişemeyen kuzularda yapılacak uyarımlar reproduktif etkinliği ve verimliliği doğrudan artırmaktadır (Edwards ve ark., 2015).

Üremenin kontrol altına alınmasında fotoperiyod uygulamaları, koç etkisi, yoğun besleme (flushing) gibi doğal yöntemler kullanılsa da pratikte koyun ve keçilerde üremeyi kontrol altına almak için GnRH, progestagenler, östrojenler, PGF2 α ve analogları, melatonin, gebe kısrak serum gonadotropini (eCG/PMSG), insan koryonik gonadotropini (hCG), melatonin gibi hormonlar ve bunların kombinasyonları kullanılmaktadır (İbiş & Ağaoğlu, 2016).

Sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri olan koç etkisi progesteron uygulamalarından sonra kısa süre içerisinde LH salınımını artırarak östrus ve ovulasyonların daha dar bir zaman aralığında senkronize bir şekilde ortaya çıkmasını sağlamaktadır (Ungerfeld, 2011). Benzer şekilde koyunlarda yapılan sabit zamanlı suni tohumlama protokollerinde progesteron uygulamalarını takiben 36-48. saatlerde GnRH uygulamaları yapılmaktadır (Reyna ve ark., 2007). Buna rağmen yapılan bazı çalışmalarda progesteron uygulamaları sonrasında GnRH enjeksiyonunun üreme etkinliği artırsa da çalışma sonunda elde edilen üreme sonuçları etkilemediği belirtilmektedir (Walker ve ark., 1989, Eppleston ve ark., 1991). Bunun yanında prepubertal hayvanlarda pubertasa geçiş sürecinde yapılan uyarımlarda daha düşük gebelik oranları elde edilmektedir (Edwards ve ark., 2015). Pubertasa geçiş

sürecinde prepubertal hayvanlarda yetişkinlere kıyasla çok daha düşük miktarlarda LH salınımı meydana gelmekte bu nedenle ilk fertil ovulasyon öncesinde ovulasyonsuz östruslar ve suböstrus olguları görülmektedir (Foster & Hileman, 2015). Prepubertal hayvanlarda makul gebelik oranları elde edilmesi amacıyla progesteron uygulamalarıyla yapılan uyarımlarda uzun süreli koç katımı yapılmaktadır (Abecia ve ark., 2016; Kıvrak, 2019).

Prepubertal hayvanlarda senkronizasyon süresini kısaltmak amacıyla geliştirilecek yeni uygulamalar maliyeti azaltarak karlılığın artmasını sağlayacaktır. Bu nedenle yapılan çalışmada modifiye-U synch yöntemi ile senkronize edilmiş, progesteron uygulamasından sonra GnRH ve hCG uygulanmış prepubertal kuzu ve primipar koyunlarda kısa süreli koç katımının östrus ile gebelik oranları üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler

Bu çalışma uygulamalarına; Cumhuriyet Üniversitesi - Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 196 sayı ve 08.02.2019 tarihli kararı ile T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'nın 71037622-325.04.02-E. 81906 sayı ve 08.01.2019 tarihli kararıyla çalışmada kullanılacak olan koyun ve koçlarda yapılacak tüm uygulamalar, hayvan hakları ve deney etiğine uygun olarak yürütüldü.

Yapılan çalışmanın materyalini; Sivas İli Gürün İlçesi 38.841171 enlem ve 37.289158 boylamda yer alan koyunculuk işletmesinde bulunan 24 aylık yaşta 30 baş primipar koyun, 10-14 aylık yaşta 45 baş prepubertal kuzu ve 24-60 aylık yaşta 7 baş Akkaraman-Kangal ırkı koç oluşturdu. Çalışma öncesinde kullanılan koyunların genel sağlık muayeneleri yapıldı ve sağlıklı olduğu belirlenen hayvanlar çalışmaya dâhil edildi. Çalışma öncesinde koç etkisinden yararlanmak amacıyla koçlar sürüden uygulamalara başlamadan 1 ay önce ayrıldı. Hayvanların beslenmesi yalnızca merada olup, uygulamalar öncesi veya uygulama süresince ilave besleme yapılmadı.

Çalışmaya dâhil edilen hayvanlar rastgele her grupta 10 primipar koyun ve 15 prepubertal kuzu olacak şekilde toplam 45'er hayvan bulunan 3 eşit gruba ayrıldı. Çalışmaya dahil edilen tüm hayvanlara 0. gün kas içi (İM) olarak 100 μ g gonadorelin diasetat tetrahidrat (Ovarelin®, CEVA) enjeksiyonu ile birlikte 20 mg flugeston asetat içeren intravaginal sünger (Chronogest®, MSD) yerleştirildi. Süngerlerin 7. gün

çıkartılmasını müteakip 600 IU eCG (PMSG-Intervet®, MSD) İM ve 131.5 µg cloprostenol sodyum (Estrumate®,MSD) İM enjeksiyonu yapıldı. Daha sonra 1. grupta bulunan hayvanlara süngerler çıkartıldıktan 56 saat sonra (10. gün) 100 µg GnRH, 2. grupta bulunan hayvanlara 600 IU hCG (Chorulon®,MSD), 3. grupta bulunan hayvanlara ise 2 ml serum fizyolojik (S.F.) solüsyonu İM olarak uygulandı. Sünger çıkartıldıktan 56 saat sonra yapılan enjeksiyonları takiben tüm gruplara 5 gün (10-15. gün) süreyle koç katımı yapıldı. Koçlar belirtilen süre içinde gün boyu koyunlarla birlikte kaldı. Koç katımı süresince en az 1 kez çiftleşen hayvanlar östrus pozitif olarak kaydedildi. Çalışma başlangıcından itibaren 38. günde tüm hayvanlara transrektal, 98. günde ise transabdominal olarak ultrasonografi (Mindray DP50/Vet/Us, 2-10 MHz koyuna spesifik transrektal linear prob, konveks prob) ile gebelik muayenesi yapıldı. Gebe olduğu belirlenen hayvanlarda gebelik muayeneleri sonrasında şekillenebilecek fetal ölümleri belirlemek için gebe hayvanların doğumları gözlemlenerek kayıt altına alındı.

Kan örneklerinin alınması ve değerlendirilmesi:

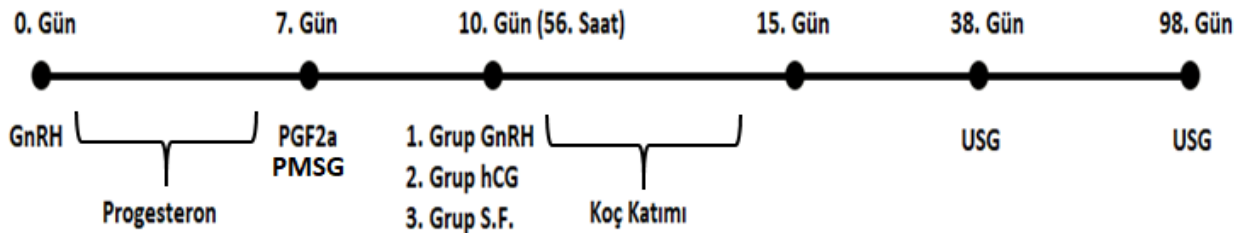
Uygulamalar esnasında (süngerler takılırken, çıkarılırken, çıkarıldıktan 56 sonra koç katımında ve tüm gebelik muayanelerinde) progesteron seviyesi belirlenebilmesi için vena jugularisten 10 ml kan örnekleri alındı. Oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra kan örnekleri soğutmalı santrifüjde 3.000 devir/5dakika olacak şekilde santrifüj edildikten sonra serum örneklerinin her birinden 2 adet 1 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak ölçüm zamanına kadar -80°C'de stoklandı. Progesteron ölçümü analitik sensitivitesi ≤0.1 ng/ml ve ölçüm aralığı: 0.1 ng/ml-36.0 ng/ml progesteron olacak şekilde ARCHITECT Progesteron Chemiluminescence (7K77) Abbott test kiti ve tam otomatik ARCHITECT -i2000SR (Abbott) cihazı kullanılarak Chemiluminescence Microparticle Immunoassay (CMIA) yöntemi ile yapıldı. Çalışma içi (intra-assay) coefficient of variation (CV)'u düşük ve

yüksek seviyeli progesteron konsantrasyonları için sırasıyla %3.4-5.5 ile %1.6-2.2 arasında değişmektedir. Analizler Serum (serum ve serum separatör tüplerine alınan kanlarda) ve Plazma (Na heparin, Li heparin ve K EDTA antikoagülanları ile) örnekleri için 32 valide edilmiştir. Belirtilen antikoagülanlar dışındaki diğer antikoagülanlarla validasyon yapılmamaktadır.

İstatistiksel analizler: Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Değişkenlerin öncelikle Shapiro wilk ve Levene testi ile normallik ve homojenlik varsayımlarını sağlayıp sağlamadığı kontrol edilmiştir. Gebe olduğu belirlenen hayvanlardaki progesteron seviyesi ortalamaları tek yönlü varyans analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Post hoc olarak Bonferonni testi kullanılmıştır. Gebe olduğu belirlenen hayvanlarda gruplar arasında tekiz ve çoklu gebelik oranları ile çiftleşen hayvanlarda gebelik oranları Monte Carlo simülasyonu kullanılarak ki-kare analizi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasında gebelik ve östrus oranları ki-kare analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. GnRH, hCG ve kontrol gruplarında gebe olduğu tespit edilen hayvanların primipar veya prepubertal olma durumu arasında ilişki ikili lojistik regresyon analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada veriler % olarak ifade edilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ ve $p < 0,01$ değerleri olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

Çalışmanın materyalini oluşturan koyunların tamamı süreci eksiksiz tamamladı. Gruplarda senkronizasyonun sağlanması adına 0. günde vagina içine uygulanan progesteron içeren süngerler 7. günde eksiksiz olarak çıkarıldı. Süngerin çıkarılması sırasında hiçbir hayvanda vaginitis belirtisi görülmedi. Ultrasonografik olarak gebe olduğu ve yavru sayısı belirlenen koyunların



Şekil 1. Gruplara yapılan uygulamaların şematik gösterimi.

Tablo 1. Gruplarda sünger takılırken, çıkarılırken ve çıkarıldıktan sonraki 56. saatteki ortalama progesteron düzeyleri.

Grup (n:25)	0.gün (sünger takılırken) Median Progesteron ng/ml (min-max)	7. gün (sünger çıkarılırken) Median Progesteron ng/ml (min-max)	10. gün (sünger çıkarıldıktan sonraki 56. Saat) Median Progesteron ng/ml (min-max)
1. Grup (GnRH)	0,19 (0,10-0,56)	0,24 (0,10-1,41)	0,43 (0,20-0,82)
2. Grup (hCG)	0,17 (0,10-1,96)	0,24 (0,11-2,04)	0,22 (0,10-2,91)
3. Grup (Kontrol)	0,18 (0,12-1,71)	0,25 (0,11-2,43)	0,37 (0,11-0,65)

Tablo 2. Gebelik muayenesi (38. Gün) sırasında ortalama progesteron düzeyleri.

Grup (n:25)	ng/ml \pm standart sapma
1. Grup (GnRH)	3,9329 \pm 1,32882
2. Grup (hCG)	5,0290 \pm 1,83126
3. Grup (Kontrol)	3,9329 \pm 1,32882

doğumları izlendi ve ultrasonografi kayıtları ile karşılaştırıldı. 38. günde yapılan gebelik muayenesinde belirlenen yavru sayıları ile doğum yavru sayılarının eşdeğer olduğu belirlendi.

Öncelikli olarak gruplarda bulunan hayvanlarda primipar ve prepubertal olma durumu ile bu hayvanlarda östrüs gösterme, gebelik, çoğul gebelik oranları ve progesteron düzeyleri arasındaki ilişki ikili lojistik regresyon analizi ile değerlendirilmiş ve grup içinde primipar ve prepubertal olma durumunun istatistiksel farklılık oluşturmadığı belirlenmiştir. Bunun için tablosal ve grafiksel gösterimlerde gruplar bir bütün olarak ele alınmıştır.

Gruplarda bulunan hayvanların yaş ortalamaları karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$). Hayvanlara süngerin çıkarılmasını takiben 56. saatte yapılan uygulamaların progesteron seviyesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla gebelik muayenesi sırasında alınan kan örneklerinde yapılan ölçümler karşılaştırıldığında gruplar arasında progesteron düzeyleri bakımından istatistiksel anlamlılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Gruplarda sünger takılırken, çıkarılırken ve çıkarıldıktan sonraki 56. saatteki ortalama progesteron düzeyleri Tablo 1'de gösterilirken 38. günde gebelik muayenesi esnasındaki progesteron düzeyi Tablo 2'de gösterildi. Hayvanların uygulamalar esnasındaki kan örneklerine ait progesteron seviyelerinin grafiksel dağılımı Şekil 2-5'de verildi.

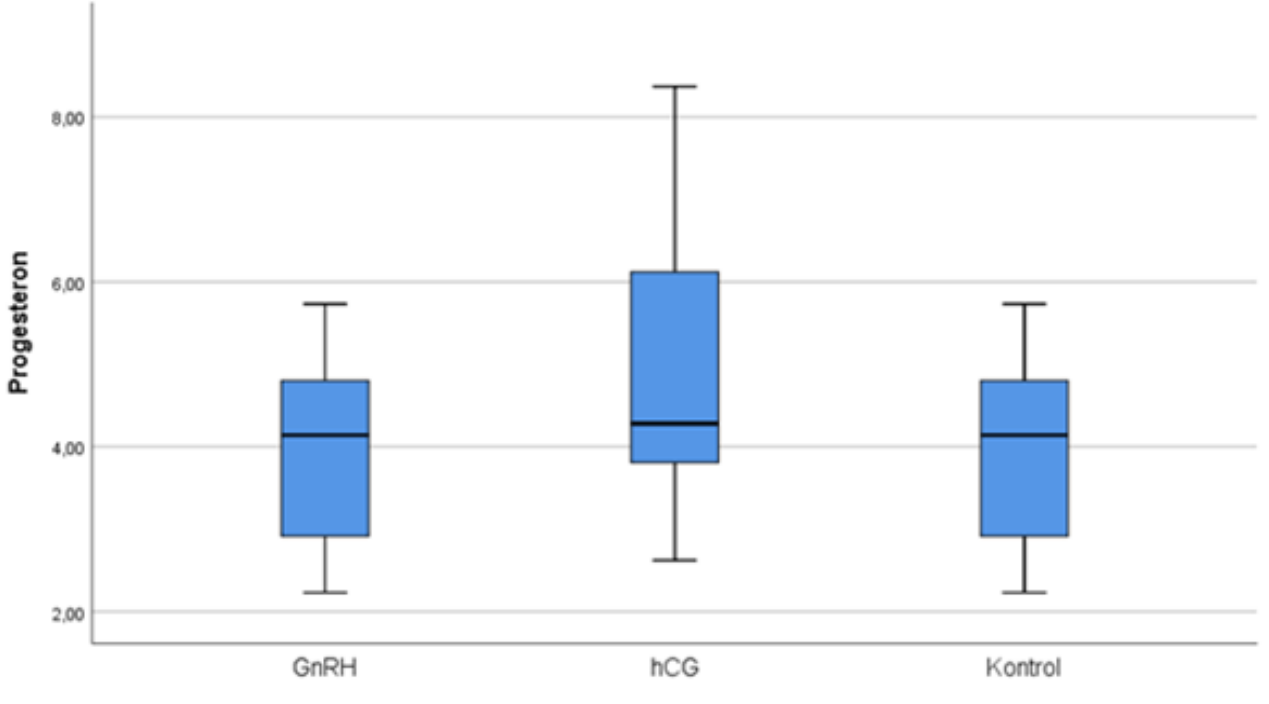
Östrüs gösterme oranları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel bir farklılık belirlenmemiştir. GnRH ve hCG grubunda 13, Kontrol grubunda ise 11 hayvanın çiftleştiği tespit edilmiştir. Gebelik muayenesinde çiftleştiği tespit edilmediği halde gebe olan bir hayvan belirlenmemiştir. Gruplar çoklu ve tekiz gebelik bakımından incelendiğinde 1. grupta (GnRH) 1 çoklu 6 tekiz 2. grupta (hCG) 6 çoklu 4 tekiz, 3. grupta 1 çoklu 7 tekiz doğum tespit edildi. Gruplardaki üremeye ilişkin bulgular Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Üreme bulguları.

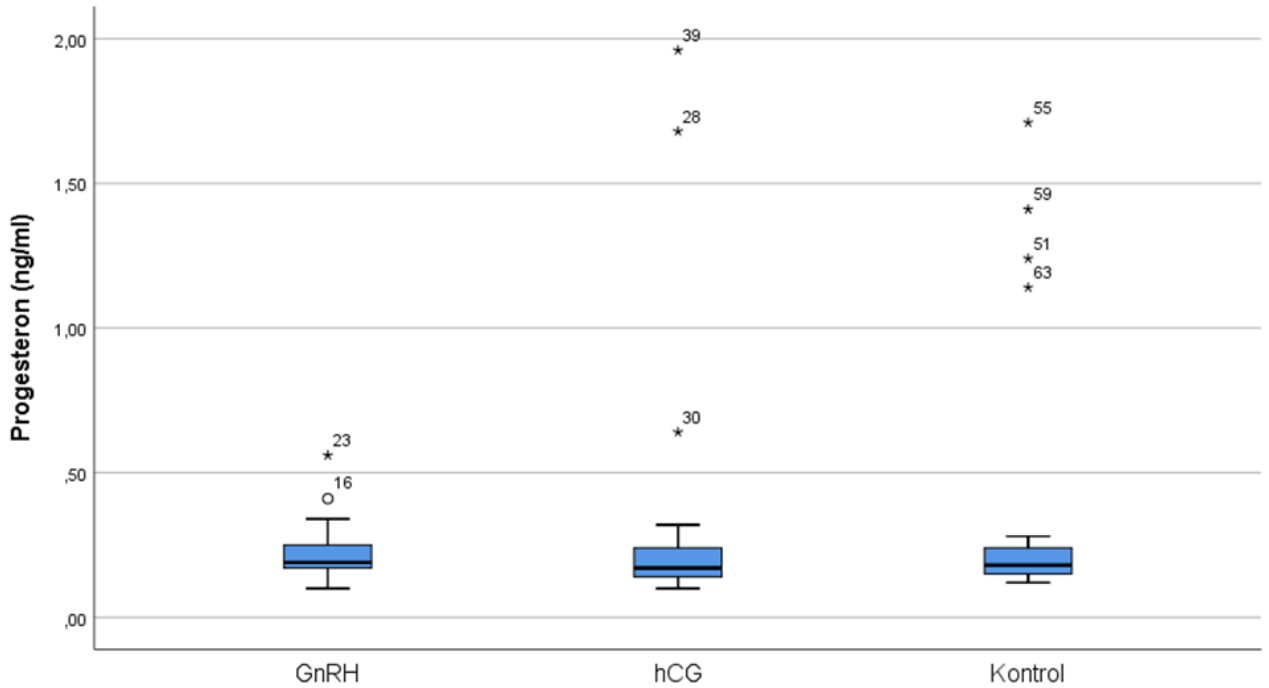
Grup (n: 25)	Östrüs oranı	Gebelik oranı	Çoğul gebelik oranı	
(1. grup) GnRH (n: 25)	Prepubertal (n:15)	% 53,33 (8/15)	% 26,66 (4/15)	% 25 (1/4)
	Primipar (n:10)	% 50 (5/10)	%30 (3/10)	% 0 (0/3)
(2. grup) hCG (n: 25)	Prepubertal (n:15)	% 46,66 (7/15)	%40 (6/15)	%66,66 (4/6)
	Primipar (n:10)	%60 (6/10)	% 40 (4/10)	%50 (2/4)
(3. grup) S.F. (n: 25)	Prepubertal (n:15)	%40 (6/15)	% 26,66 (4/15)	%25 (1/4)
	Primipar (n:10)	%50 (5/10)	% 40 (4/10)	% 0 (0/4)

Tablo 4. Gruplar içerisinde çoklu ve tekiz gebelik oranları. (* Aynı harfler arasında istatistiksel farklılık tespit edilmemiştir (p=0,058). Oransal hesaplamalar her grup için ayrı ayrı tekiz ya da çoklu gebelik sayısı / grupta bulunan gebe sayısı olacak şekilde hesaplanmıştır).

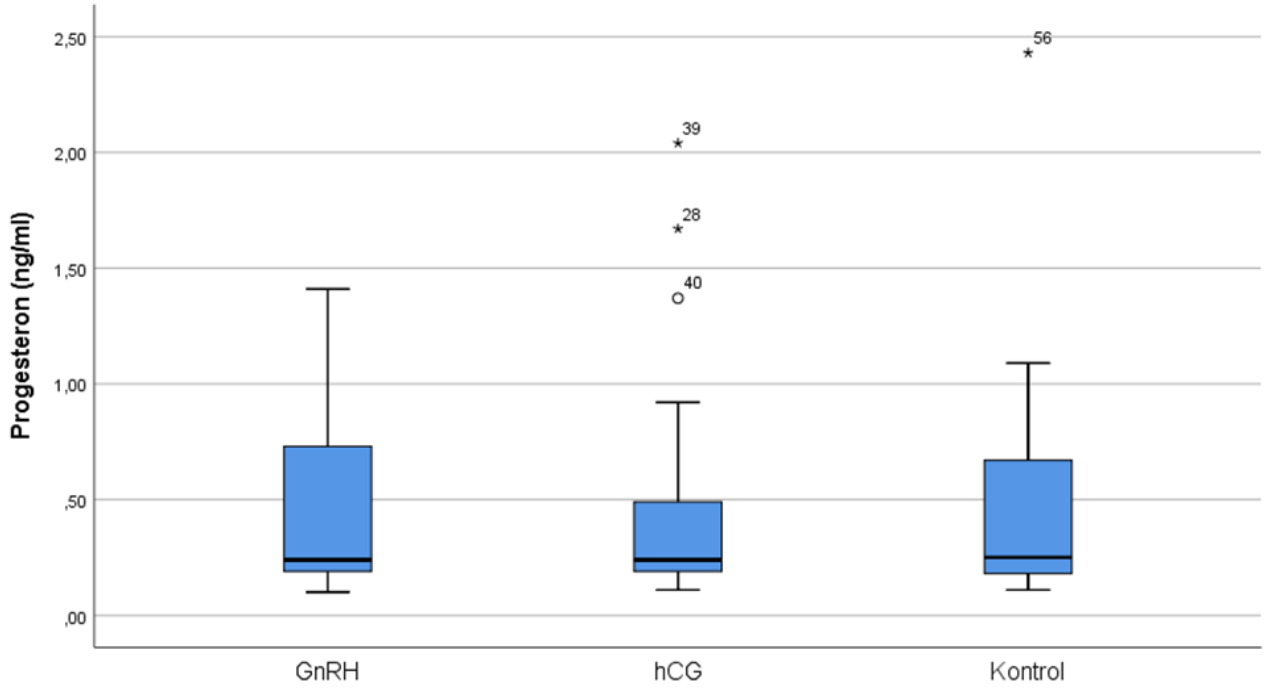
Grup	Gebelik oranı (kümülatif)	Çoklu	Tekiz
(1. grup) GnRH (n:25)	28,0% ^a	14,3% ^a	85,7% ^a
(2. grup) hCG (n:25)	40,0% ^a	60,0% ^a	40,0% ^a
(3. grup) S.F. (n:25)	32,0% ^a	12,5% ^a	87,5% ^a



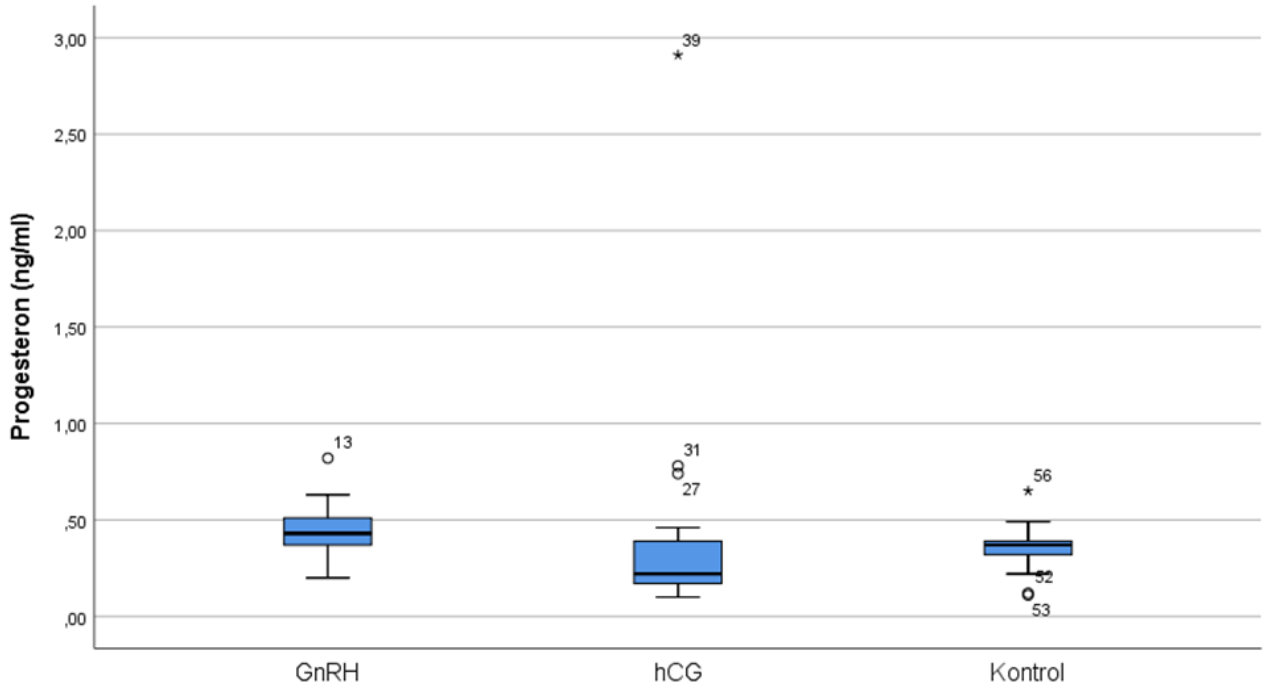
Şekil 2. Gruplarda 38. günde gebelik muayenesinde progesteron düzeyi dağılımı.



Şekil 3. Gruplarda 0. günde süngerlerin takıldığı esnada progesteron düzeyi dağılımı.



Şekil 4. Gruplarda 7. günde süngerlerin çıkarıldığı esnada progesteron düzeyi dağılımı.



Şekil 5. Gruplarda 10. günde (süngerler çıkarıldıktan sonraki 56. saat) progesteron düzeyi dağılımı.

Gruplar toplam (Prepubertal + Primipar) olarak çoğul gebelik yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel fark belirlenmemiştir ($p=0,058$). Grup içerisinde tekiz ve çoklu gebelik oranları Tablo 3'de gösterilmiştir.

Ultrasonografi ile yapılan gebelik muayeneleri sırasında 38. ve 98. günlerde gerçekleştirilen muayenelerde aynı sonuçlar elde edildi. Bu nedenle hiçbir grupta erken

fetal ölüm ya da abortus şekillenmediği kabul edildi. Gebelik sayıları incelendiğinde 1. grupta (GnRH) 7, 2. grupta (hCG) 10, 3. grupta 8 hayvanın gebe olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında belirgin bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$). Gebelik oranları Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tartışma

Koyunların anöstrüs döneminde reproduktif olarak etkin olmayışı işletme verimliliğinin en önemli problemi olarak karşımıza çıkmaktadır (Knight ve ark., 1983). Koyunların ovaryumlarının foliküler dinamizm açısından anöstrüs döneminde tamamen durgun olmadığı veya dinamik olduğu bilinmektedir. Bu dönemde FSH sentezinin devam ettiği ve bu FSH dalgalanmalarına paralel olarak foliküler gelişim dalgalanmalarının da mevcudiyeti bilinmekte (Bartlewski ve ark., 1998) ve anöstrüs periyodunda foliküler aktivitenin devam etmesine istinaden ovulasyona yapılacak müdahaleler ile gebeliklerin elde edilebildiği üretim sistematiğine ulaşılabilmektedir (Simões, 2015). Bu çalışmada Sivas il sınırları içerisinde uzun yıllardır yetiştiriciliği yapılan bölgesel bir ırk olan Akkaraman Kangal ırkı prepubertal kuzu ve primipar koyunlar kullanılarak yetiştiriciler için en önemli ekonomik getiri olan kuzu üretimini artırmak amacıyla anöstrüs periyodunda farklı östrüs senkronizasyon yöntemleri kullanılarak seksüel uyarım gerçekleştirilmeye ve böylece etkin bir üreme verimliliği yöntemi belirlenmesi amaçlandı.

LH ve hCG'nin benzer yapıya sahip olmaları ve aynı reseptörlere bağlanabilmeleri sebebiyle benzer etki gösterdikleri bilinmektedir (Laphorn ve ark., 1994). Birçok hayvan türünde uygulanan hormon protokollerinde hCG ovulasyon indükleyici olarak kullanılmaktadır (Ginther ve ark., 2009). Çiftleşme periyoduna yakın bir zaman diliminde hCG uygulamalarının çoğul gebelik oranlarını artırdığı ancak fertilitate ve kuzulama oranlarını düşürdüğü belirlenmiştir (Zamiri & Hosseini, 1998). P₄ destekli vajinal sponjun 9 gün süreyle uygulanıp çıkarıldığı bir çalışmada bir gruba sünger çıkarıldıktan 24 saat sonra 500 IU hCG uygulanırken diğer gruba uygulanmamıştır. Yapılan muayenelerde ovulatör folikülün çapları her iki grupta benzerlik gösterirken hCG uygulamasının sadece sponj çıkarılmasıyla ovulasyon şekilleninceye kadar ki süreyi kısalttığı bununla beraber gebelik oranlarını düşürdüğü belirlenmiştir (Dias ve ark., 2018). Mevcut çalışmada sünger çıkarıldıktan 56 saat sonra 2. gruba 600 IU hCG uygulaması yapılarak ve koç katımı yapıldı. Böylece hCG uygulamasının reproduktif parametreler (Östrüs gösterme, gebe kalma ve çoğul gebelik oranları) üzerine etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı. Gruplar arasında reproduktif parametreler yönünden istatistiksel fark bulunamamasına rağmen hCG uygulanan grupta çoğul gebelik sayısının her iki gruptan da fazla olduğu belirlendi. Bununla birlikte sünger uzaklaştırıldıktan

sonra hCG uygulamasının fertilitate ve kuzulama oranlarını üzerine etkisi tam olarak belirlenemedi. GnRH yüksek oranda olmasa da anöstrustaki koyunlarda ovaryum faaliyetlerini ve senkronize sikluslarda ovulasyon şansını arttırmak için kullanılabilir. Üreme mevsiminde yapılan senkronizasyon çalışmalarında sünger çıkarılmasından 24 saat sonra GnRH'nin 100 µg dozunda uygulanabildiği bilinmektedir. Ancak, bu uygulamanın anöstrüs döneminde ovulasyon zamanına pek etkisinin olmadığı bilinmektedir (Özyurtlu & Bademkiran, 2010). Anöstrüste yapılan mevcut bu çalışmada da benzer şekilde sünger çıkarıldıktan sonra GnRH uygulanıp uygulanmamasının üreme parametreleri üzerine etkisinin olmadığı belirlendi.

Sezon dışı yapılan bir çalışmada materyal olarak bizim çalışmamızdaki prepubertal kuzuların yaş aralığındaki Romney-cross ırkı prepubertal kuzular kullanılmıştır. Standart U-synch senkronizasyon protokolünün uygulandığı çalışmada 0. gün progesteron içeren vajinal gerecin uygulandığı esnada 50 µg dozunda GnRH uygulanmış ve 7 gün sonra vajinal gerecin çıkarıldığı esnada 125 µg PGF_{2α} ve 400 IU PMSG (eCG) uygulanmıştır (Martinez ve ark., 2015). Uygulamacılar bu uygulamalar sonucunda % 50 gebelik elde ederken bizim çalışmamızda gruplardaki prepubertal kuzularda (Grup 1, 2 ve 3) gebelik oranları daha düşük bulunmuştur (sırasıyla % 26,66 (4/15), %40 (6/15) ve % 26,66 (4/15)). Akkaraman Kangal ırkı prepubertal kuzuların uyarımında U-synch temelli programların etkili olmadığı belirlenmiştir.

Prepubertal kuzularda yapılan uyarım çalışmaları incelendiğinde çalışmaların büyük çoğunluğunda prepubertal kuzularda reproduktif etkinliğin artırılması amacıyla uzun süreli (60 gün) koç katımı uygulanmıştır. Farklı yöntemler kullanılarak yapılan bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar oldukça değişkendir. Abecia ve ark (2016) yaptıkları çalışmada prepubertal kuzularda seksüel olarak uyarılmış koçların kullanımı ile %60'ın üzerinde oranında ovulasyon elde edilirken kontrol grubunda ovulasyon görülmemiştir. Bunun yanında Kassem ve ark., 1989 yaptıkları çalışmada koç katımı sonrasında prepubertal kuzularda ortalama gebe kalma süresi 260 gün olarak belirlenmiştir. Bunun yanında kısa süreli koç katımı uygulanan bir çalışmada (Kivrak 2019) 5 günlük koç katımı sonrasında uygulama grubunda bulunan hayvanlarda %80'in üzerinde ovulasyon görülmüş ancak gebelik elde edilememiştir. Yapılan çalışmada koçlara uyarım amacıyla herhangi bir uygulama yapılmadı ve koçlar 5 gün süreyle süreye

katıldı. Ancak uygulama sonrasında en fazla %40 oranında gebelik elde edilmiştir. Bu nedenle prepubertal kuzularda kısa süreli koç katımı ile makul sonuçlar elde edilebilmesi için alternatif uygulamalara ihtiyaç olduğu kanısına varılmıştır.

Sonuçlar

Modifiye U-synch yöntemi ile anöstrüste Akkaraman Kangal ırkı prepubertal toklu ve primipar koyunlarda benzer reproduktif sonuçlar elde edilmiştir. Ancak hem prepubertal kuzularda hemde primipar koyunlarda modifiye U-synch yöntemi ve kısa süreli koç katımı ile etkin reproduktif başarı elde edilemediği kanısına varılmıştır. Gruplardaki prepubertal kuzularda (Grup 1, 2 ve 3) gebelikler oldukça düşük iken (sırasıyla % 26,66 (4/15), %40 (6/15) ve % 26,66 (4/15)) aynı şekilde primipar koyunlarda da gebelikler oldukça düşük bulunmuştur (sırasıyla % 30 (3/10), %40 (4/10) ve % 40 (4/10)). Modifiye U-synch yönteminde 2. GnRH enjeksiyonun reproduktif parametrelere katkı sağlamadığı belirlenmiştir. Bunun için bu enjeksiyon yerine sünger çıkarıldıktan sonra koç etkisinin artırılmasına yönelik çalışmaların yapılmasının ovulasyon üzerine daha olumlu katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

Kaynaklar

Abecia JA, Chemineau P, Gómez A, Keller M, Forcada F, Delgado JA (2016) Presence of photoperiod-melatonin-induced, sexually-activated rams in spring advances puberty in autumn-born ewe lambs. *Anim Reprod Sci* 170: 114-120. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.011>.

Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A (2012) Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 130(3-4): 173-179. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.011>

Bartlewski PM, Baby TE, Giffin JL (2011) Reproductive cycles in sheep. *Anim Reprod Sci* 124(3-4): 259-268. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.024>

Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC (1998) Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J Reprod Fertil* 113(2): 275-285. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1130275>

Dias L MK, Sales JNS, Viau P, Barros MBP, Nicolau SS, Simões LMS, Oliveira CA (2018) Although it induces synchronized ovulation, hCG reduces the fertility of Santa Ines ewes submitted to TAI. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 70(1): 122-130. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9679>

Edwards SJ, Juengel JL, O'Connell AR, Johnstone PD, Farquhar PA, Davis, GH (2015) Attainment of puberty by ewes in the first year of life is associated with improved reproductive performance at 2 years of age. *Small Rumin Res*

123(1): 118-123. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.11.006>

Eppleston J, Evans G, Roberts EM (1991) Effect of time of PMSG and GnRH on the time of ovulation, LH secretion and reproductive performance after intrauterine insemination with frozen ram semen. *Anim Reprod Sci* 26: 227-237. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(91\)90049-6](https://doi.org/10.1016/0378-4320(91)90049-6)

Foster DL, Hileman SM (2015) Puberty in the sheep. In: Plant TM, Zeleznik AJ (ed) *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (Vol. 2), 3rd edn. Academic Press Elsevier, London, pp 1441- 1485.

Ginther OJ, Beg MA, Gestal EL, Gestal MO, Cooper DA (2009) Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17 β -estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. *Anim Reprod Sci* 114(1-3): 311-317. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.08.026>

Gómez-Brunet A, Santiago-Moreno J, Campo AD, Malpau B, Chemineau P, Tortones DJ, López-Sebastián A (2008) Endogenous circannual cycles of ovarian activity and changes in prolactin and melatonin secretion in wild and domestic female sheep maintained under a long-day photoperiod. *Biol Reprod* 78(3): 552-562. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064394>

İbiş M, Ağaoglu AR (2016) Koyun ve keçilerde üremenin senkronizasyonu. *MAE Vet Fak Derg* 1(2): 47-53.

Kassem R, Owen JB, Fadel I (1989) The effect of pre-mating nutrition and exposure to the presence of rams on the onset of puberty in Awassi ewe lambs under semi-arid conditions. *Animal Sci* 48(2): 393-397. <https://doi.org/10.1017/S0003356100040381>

Kıvrak (2019). Prepubertal dişi kuzularda aşım sezonu dışında uygulanan sülpirid'in reproduktif etkisinin belirlenmesi. Doktora tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık bilimleri enstitüsü

Knight TW, Tervit HR, Lynch PR (1983) Effects of boar pheromones, ram's wool and presence of bucks on ovarian activity in anovular ewes early in the breeding season. *Anim Reprod Sci* 6(2): 129-134. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(83\)90017-9](https://doi.org/10.1016/0378-4320(83)90017-9)

Laphorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, Isaacs NW (1994) Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 369(6480): 455.

Lewis RM, Notter DR, Hogue DE, Magee BH (1996) Ewe fertility in the STAR accelerated lambing system. *J Anim Sci* 74(7): 1511-1522. <https://doi.org/10.2527/1996.7471511x>

Martinez M F, McLeod B, Tattersfield G, Smail B, Quirke LD, Juengel J L (2015) Successful induction of oestrus, ovulation and pregnancy in adult ewes and ewe lambs out of the breeding season using a GnRH+ progesterone oestrus synchronisation protocol. *Anim Reprod Sci* 155: 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.010>

Özyurtlu N, Bademkiran S (2010) Koyunlarda östrus senkronizasyonu ve östrusu uyarma yöntemleri. *Dicle Üniv Vet Fak Derg* (1): 17-22.

Pampori ZA, Sheikh AA, Aarif O, Hasin D, Bhat IA (2018) Physiology of reproductive seasonality in sheep—an update. *Biol Rhythm Res* 1-13. <https://doi.org/10.1080/09291016.2018.1548112>

Reyna J, Thomson PC, Evans G, Maxwell WM (2007) Synchrony of ovulation and follicular dynamics in merino ewes treated with GnRH in the breeding and non-breeding

seasons. *Reprod. Domest. Anim.* 42: 410-417 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00800.x>

Simões J (2015) Recent advances on synchronization of ovulation in goats, out of season, for a more sustainable production. *Asia Pac J Rural Dev* 4(2): 157-165. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(15\)30014-2](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(15)30014-2)

Ungerfeld R (2011) Combination of the ram effect with PGF2 α estrous synchronization treatment in ewes during the breeding season. *Anim Reprod Sci* 124: 65-68. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.021>

Valasi I, Chadio S, Fthenakis GC, Amiridis GS (2012) Management of pre-pubertal small ruminants: Physiological basis and clinical approach. *Anim Reprod Sci* 130(3-4): 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.005>

Walker SK, Smith DH, Godfrey B, Seamark RF (1989) Time of ovulation in the South Australian Merino ewe following synchronization of estrus. 1. Variation within and between flocks. *Theriogenology* 31: 545-553. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90239-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90239-2)

Weems PW, Goodman RL, Lehman MN (2015) Neural mechanisms controlling seasonal reproduction: principles derived from the sheep model and its comparison with hamsters. *Front Neuroendocrinol* 37: 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.12.002>

Wildeus S (2000) Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats 1, 2. *J Anim Sci* 77(E-Suppl): 1-14. <https://doi.org/10.2527/jas2000.00218812007700ES0040x>

Zamiri MJ, Hosseini M (1998) Effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and phenobarbital on the reproductive performance of fat-tailed Ghezel ewes. *Small Rumin Res* 30(3): 157-161. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(98\)00099-6](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(98)00099-6)



Sivas ve İlçelerindeki Neonatal İshalli Buzağılarda *E. coli*, *Cryptosporidium*, *Clostridium perfringens*, *Rotavirüs* ve *Coronavirüs* Prevalansı

Canan Caner Küliğ, Alparslan Coşkun*

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları AD, 58140, Kampüs, Sivas, Türkiye

*Corresponding Author's E-Mail: acoskun@cumhuriyet.edu.tr

Özet

Bu çalışmanın amacı; Sivas ve ilçelerindeki, neonatal buzağılarda şekillenen ishallerin etiolojisinde yer alan *E. coli*, *Cryptosporidium*, *Clostridium perfringens*, *Rotavirüs* ve *Coronavirüs* etkenlerinin prevalansını tespit etmektir. Çalışmanın materyalini Yıldızeli, Kangal, Suşehri, Şarkışla-Gemerek ilçeleri ve Sivas Merkezde 1 ila 30 gün yaş aralığındaki neonatal dönemde bulunan ve klinik muayene neticesinde ishal tespit edilen buzağılar oluşturdu. Çalışmada, Sivas merkezden 30, Yıldızeli'den 32, Kangal'dan 30, Şarkışla-Gemerek'ten 30 ve Suşehri'nden 16 adet olmak üzere 66'sı dişi, 72'si erkek toplam 138 adet ishalleri buzağı kullanıldı. Buzağuların 47'si simental, 26'sı montofon, 29'u simental melezi ve 36'sı montofon meleziydi. İshalleri buzağular yaşlarına göre kayıt edilerek, alınan dışkı örneklerinde *E. coli*, *Cryptosporidium*, *Clostridium perfringens*, *Rotavirüs* ve *Coronavirüs* yönünden hızlı test kiti kullanılarak analizler yapıldı. Klinik muayene neticesinde ishal tespit edilen neonatal dönemdeki 138 adet buzağıdan alınan dışkı örneklerinde yapılan analiz sonucunda miks olarak %38 *Clostridium perfringens*, %26 *E. Coli*, %22 *Rotavirüs*, %9 *Coronavirüs* ve %7 *Cryptosporidium spp.* tespit edildi. Sonuç olarak, Sivas bölgesi neonatal ishalleri buzağılarda en yaygın oranda *Cl. perfringens* ve *E. coli* belirlenirken 1-7 günlük buzağılarda ise en yaygın olarak *E. coli* tespit edilmiştir. Korunma ve tedavi stratejileri oluşturulurken özellikle bu etkenlerin göz önüne alınması gerektiği kanısına varılmıştır.

Geliş Tarihi 19 March 2019

Revizyondan Geliş Tarihi 6 Ağustos 2019

Kabul Tarihi 20 Ağustos 2019

Anahtar kelimeler:

Buzağı, ishal, etiyojisi, Sivas

Cite this article: Caner Küliğ C, Coşkun A, (2019) Sivas ve İlçelerindeki Neonatal İshalleri Buzağılarda *E. coli*, *Cryptosporidium*, *Clostridium perfringens*, *Rotavirüs* ve *Coronavirüs* Prevalansı. Turk Vet J, 1(2):69-73.

Prevalence of *E. coli*, *Cryptosporidium*, *Clostridium perfringens*, *Rotavirus* and *Coronavirus* in Neonatal Calves with Diarrhea in Sivas

Abstract

The aim of this study; To determine the prevalence of *E. coli*, *Cryptosporidium*, *Clostridium perfringens*, *Rotavirus* and *Coronavirus* in neonatal calves with diarrhea in Sivas. The material of the study consisted of 138 diarrheic calves in the neonatal period between 1 to 30 day age, in Yıldızeli, Kangal, Suşehri, Şarkışla-Gemerek and center of Sivas. Calves were recorded according to their age, and fecal samples were analyzed for *E. coli*, *Cryptosporidium*, *Clostridium perfringens*, *Rotavirus* and *Coronavirus* using rapid test kit. As a result of laboratory examination 38% *Clostridium perfringens*, 26% *E. Coli*, 22% *Rotavirus*, 9% *Coronavirus* and 7% *Cryptosporidium spp.* were detected in neonatal calves with diarrhea. Consequently, *Cl. perfringens* and *E. coli* were found to be the common in neonatal diarrhea calves in Sivas region, whereas *E.coli* was most widespread for 1-7 day calves. It was concluded that these factors should be taken into consideration when designing prophylaxis and cure strategies.

Key words: Calf, diarrhea, ethiology, Sivas

Giriş

Neonatal buzağı ishalleri dünyada ve ülkemizde buzağı yetiştiriciliğinin en önemli sorunlarından biri olmakla beraber bilhassa doğumdan sonraki 1-10 gün ve genel olarak ilk 30 günde etkili olmaktadır (Radostits ve ark., 2007). İshal, enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan sebeplere bağlı olarak oluşan ve dışkıının içerisindeki sıvı miktarının, volumünün ve atılım sıklığının

artmasıyla kendini gösteren bir semptomdur (Roy., 1980). İshallerin etiopatogenezinde mikrobiyolojik, çevresel, nutrisyonel, immünolojik, genetik gibi birçok faktör rol oynamaktadır (Roy, 1980; Cho & Kyung, 2014). Enfeksiyöz etkenler tek ya da miks olarak buzağılarda ishalleri sebebiyet verirler (Khan & Khan, 1991; Radostits ve ark., 2007). Yapılan çalışmalarda,

buzağı ishallerinde bakteriyel etkenlerden *E.coli*'nin, viral etkenlerden *Rotavirüs* ve *Coronavirüs*'lerin, paraziter etkenlerden ise *Cryptosporidium*, *Toxocara* ve *Eimeria*'ların daha yaygın biçimde rol oynadığı bildirilmiştir (Khan & Khan 1991). Bununla birlikte neonatal dönemde sıklıkla *E.coli*, *Cryptosporidium*, *Rotavirüs* ve *Coronavirüs*'lerden kaynaklı ishaller tespit edilmiştir (Khan & Khan, 1991; De La Fuente ve ark., 1998; Langoni ve ark., 2004; Lorenz ve ark., 2011a). Bu enfeksiyöz etkenlerin dışında ahır şartlarının elverişli olmaması, toplu yetiştirme, ahırlarda kullanılan araçların temizlik ve dezenfeksiyonunun yapılmaması, yeni doğan buzağılara kolostrumun uygun zamanda ve yeterli miktarda ya da hiç verilmemesi ve doğum sonrası göbek kordonu dezenfeksiyonunun yapılmaması gibi birçok faktörün ishal oluşumunda etkili olduğu bildirilmektedir (Khan & Khan, 1991; Radostits ve ark., 2007; Lorenz ve ark., 2011a; Lorenz ve ark., 2011b). Neonatal buzağılarda ishal artmış sekresyon ya da azalan absorpsiyon neticesinde görülür (Şentürk, 2006). *E.coli*, *Salmonella* ve *Campylobacter* türleri sekrotorik ishale, protozoa ve enterik virüsler ise malabsorbtif ishale sebep olurlar. İshallerde sulu dışkı, süt alımında azalma, ince bağırsak florasında değişimler, ekstraselüler elektrolit (sodyum, potasyum, klor) ve bikarbonat kaybı şekillenir. Bütün bu değişiklikler neticesinde ishallerde dehidrasyon, metabolik asidozis, elektrolit anormallikleri, hipotermi ve septisemi şekillenir (Başoğlu ve ark., 2004; Güzelbekteş ve ark., 2007; Radostits ve ark., 2007). Dehidrasyonun şekillenmesi durumunda ilk olarak, yaşamın devamını sağlamak ve organ hasarını önlemek amacıyla oluşan ekstraselüler sıvı kaybı, intraselüler sıvının plazmaya geçmesiyle kompanze edilir (Özkan & Akgül, 2004). İshal vakalarında sebep ne olursa olsun defekasyon sıklığı ve artışı, dışkının su miktarında ve hacminde artış, alimenter kanal geçiş zamanında azalma ve dehidrasyon bulguları her zaman gözlemlenmektedir (Şentürk, 2006). Diyareye bağlı gelişen sıvı kaybıyla beraber sıvı elektrolit dengesinde değişiklikler gözlemlenir ve ekstraselüler sıvının %15'i kaybolduğu zaman klinik belirtiler ortaya çıkar, bu oran %30'a vardığında ölüm kaçınılmazdır (Turgut & Ok, 1997). Neonatal dönem ishallerinde etken teşhisinin kısa sürede yapılması, özellikle sahada çalışan veteriner hekimler için hastalığın teşhisi ve tedavisinde önemlidir. Bu çalışmanın amacı Sivas bölgesinde neonatal dönemde şekillenen buzağı ishallerine neden olan etkenlerin prevalansının tespiti yapılarak tedavi ve korunma yollarına katkı sağlamaktır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmanın hayvan materyalini, Ekim 2017-Kasım 2018 tarihleri arasında Sivas merkez, Suşehri, Kangal, Yıldızeli ve Şarkışla-Gemerek ilçelerinde 1-30 günlük 66 dişi ve 72 erkek olmak üzere toplam 138 neonatal buzağı oluşturdu. Klinik muayene sonucunda ishal tespit edilen Sivas merkezden 30, Yıldızeli'den 32, Kangal'dan 30, Şarkışla-Gemerek'ten 30 ve Suşehri'nden 16 adet buzağı çalışmaya alındı. Buzağuların 47'si simental, 26'sı montofon, 29'u simetal melezi ve 36'sı montofon meleziydi. İshalleri buzağılardan dışkı örnekleri rektal uyarım ile steril dışkı kaplarına alındı. Dışkı analizleri *Rotavirüs*, *Coronavirüs*, *Cryptosporidium*, *Clostridium perfringens* ve *E. coli* (F5-K99) enteropatojenlerini içeren ticari immunokromatografik hazır tanı kiti (Bio-X Diagnostics S.A. Belçika) kullanılarak yapıldı.

Bulgular ve Tartışma

İshal tespit edilen neonatal buzağuların dışkılarından immunokromatografik hazır tanı kiti ile yapılan test sonucunda 138 adet buzağıdan 27'sinde (%20) çalışmada aranan enteropatojenlerden hiçbirine rastlanmazken, 111 (%80) tanesinde bir ya da daha fazla enteropatojen tespit edildi. Buzağılardan 36 (%26) tanesinde *E. coli*, 30 (%22) tanesinde *Rotavirüs*, 13 (%9) tanesinde *Coronavirüs*, 53 (%38) tanesinde *Clostridium perfringens*, 9 (%7) tanesinde *Cryptosporidium spp.* tek ya da mix olarak belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Dışkı analizi sonucunda bulunan enteropatojenlerin toplam sayıları ve toplam buzağı sayısına göre yüzdelik oranları.

	Yüzdelik oran
Toplam buzağı sayısı	%100 (138)
Negatif	%20 (27/138)
Pozitif	%80 (111/138)
<i>Rotavirüs</i>	%22 (30/138)
<i>Coronavirüs</i>	%9 (13/138)
<i>E. coli</i>	%26 (36/138)
<i>Cryptosporidium spp.</i>	%7 (9/138)
<i>Clostridium perfringens</i>	%38 (53/138)

İshalleri buzağuların 55 adedi 1-7 günlük, 38 adedi 7-15 günlük, 22 adedi 15-21 günlük ve 23 adedi ise 21-30 günlük yaşaydı (Tablo 2). *E. coli* 1-7 günden büyük buzağılarda tespit edilmedi. *Rotavirüs* neonatal dönemin içindeki bütün günlerde tespit edildi. *Coronavirüs*'lere

ise 21-30 gün aralığında rastlanılmadı. *Clostridium perfringens*'e neonatal dönemin bütününde rastlanıldı. *Cryptosporidium*' a ise özellikle neonatal dönemin sonunda sıklıkla rastlanıldı (Tablo 3).

Sivas merkezde *Cl. perfringens* ve *E. coli*, Şarkışla-Gemerek, Yıldızeli ve Suşehri ilçelerinde *Cl. perfringens*, Kangal'da *E. coli* ishali buzağılarda en yaygın gözlenen etken olarak belirlendi. İshali buzağıkların etiyojisinde tek başına etken olarak %23'ünde *E. coli*, %7'sinde *Rotavirüs*, %4'ünde *Coronavirüs*, %22'sinde *Clostridium perfringens* ve %4'ünde ise *Cryptosporidium spp.* tespit edildi.

Çalışmamızda kullanılan 138 adet ishali buzağının 53'ünde (%38) tek ya da miks olarak, 31 'inde (%22) ise tek olarak *Cl. perfringens* tespit edildi ve *Cl. perfringens*'in neonatal dönemin her aşamasında ishalle sebep olduğu ve miks enfeksiyon oluşumuna katkı

sağladığı görüldü. Eman ve ark. (2007)'nin Mısır'da yaptığı çalışmada %85,7 oranında *Cl. perfringens* tespit edilmiştir. Selim ve ark. (2017) yine Mısır'da yaptıkları çalışmalarında 227 örnekten konvansiyonel ve moleküler yöntemle 168'inde *Cl. perfringens* izole edilmiştir. Güneş ve ark. (2004)'nin Kars bölgesindeki çalışmalarında *Cl. perfringens* tip A toksini %39.4 oranında tespit etmişlerdir. Çalışma bulgularımız Güneş ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışma ile uyumludur. *Clostridium spp.* normal barsak florasının bir parçası olduğundan hastalıklardaki rolünü belirlemek güçtür (Güneş ve ark., 2004). Çalışma bulgularında *Cl. perfringens*'in farklı oranlarda bulunmasının bölgesel ve iklimsel farklılıklardan kaynaklanabileceğinin yanı sıra değişik yaş gruplarının çalışmalara dahil edilmesi ve ilçelerdeki coğrafi farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Tablo 2. İlçelere göre neonatal buzağıkların ishal dağılımları.

Yaş (gün)	Merkez	Şarkışla-Gemerek	Yıldızeli	Suşehri	Kangal	Toplam
1-7	18	11	9	4	13	55
7-15	8	9	10	4	7	38
15-21	1	6	7	3	5	22
21-30	3	4	6	5	5	23
Toplam	30	30	32	16	30	138

Tablo 3. Dışkı analizi sonucunda enteropatojen sayı ve yaş aralığı dağılımı.

	Yüzdellik oran	Yaş aralığı (gün)				Gaita Bilgisi
		1-7	7-15	15-21	21-30	
Negatif	%20 (27/138)					
Pozitif	%80 (111/138)					
<i>E. coli</i>	%23 (32/138)	32				Sarı, sulu, pis kokulu
<i>Rotavirüs</i>	%7 (10/138)	2	4	4		Açık sarı
<i>Coronavirüs</i>	%4 (5/138)	5				Sarı, mukuslu, pis kokulu
<i>Clostridium perfringens</i>	%22 (31/138)	5	13	6	7	Sarı, yeşil
<i>Cryptosporidium spp.</i>	%4 (5/138)	1	2		2	Sarı, mukuslu,
<i>Rotavirüs + Coronavirüs</i>	%3 (4/138)	1	2	1		
<i>Rotavirüs + Cl. perfringens</i>	%9 (13/138)	2	2	8	1	
<i>Rotavirüs + Coronavirüs + Cl. perfringens</i>	%1 (1/138)	1				
<i>Cl. perfringens + Rotavirüs + E. coli</i>	%1 (1/138)	1				
<i>Cl. perfringens + Coronavirüs</i>	%1 (3/138)	2	1			
<i>Cl. perfringens + Cryptosporidium spp.</i>	%1 (2/138)			1	1	
<i>Cl. perfringens + E. coli</i>	%2 (3/138)	3				
<i>Rotavirüs + Cryptosporidium spp.</i>	%1 (1/138)		1			

Yapmış olduğumuz çalışmada *E. coli* % 26 oranında tespit edilmiş olup vakaların görülme yaşı aralığı 1-7 gün olarak gözlenmiştir. Ülkemizde Kozat ve Tuncay (2017) Siirt'te *E. coli*'yi %6; Al ve Balıkcı (2012) Elazığ'da %17; Kaya ve Coşkun (2018) Tokat'ta %7.48 olarak bulmuşlardır ki bu oranlar yapmış olduğumuz çalışmadaki oranlardan düşüktür. Bu durumun çalışmada kullanılan buzağuların yaşları çevresel, iklimsel ve bölgesel farklılıkları ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Torsein ve ark. (2011) İsviçre'de *E. coli*'yi %0.3; Bartels ve ark. (2010) Almanya'da %2.60; Suresh ve ark.(2012) Hindistan'da; %16.1 ve De la Fuente (1998) İspanya'da *E. coli* ve *C. parvum* miks oranını %27.8 oranında bulmuşlardır. Çalışmamızda %23 tek olarak, miks olarak %26 *E. coli* oranı De la Fuente (1998)'nin yaptığı çalışma ile yakın oranda bulundu.

Bu çalışmada *Rotavirüs*'lerin tek başına %7 oranında ishale sebep oldukları miks olarak ise %22 oranında ishal etiolojisinde buldukları tespit edildi. *Rotavirüs*'lerin tek ya da miks olarak vermiş oldukları yüzdelere arasındaki farkın fazla çıkmasının sebebinin *Rotavirüs* enfeksiyonlarının genellikle miks enfeksiyon şeklinde kendini göstermesi olduğu düşünülmektedir. Garcia ve ark.'larının (2000) İspanya'da yapmış oldukları bir çalışmada *Rotavirüs* 1-7 gün aralığında tek başına %15.6 oranında çıkarken miks olarak %46.9 oranında; 8-14 gün aralığında tek başına %12.3 oranında çıkarken miks olarak %45.6; 15-21 gün aralığında tek başına %13.2 çıkarken miks olarak %33.8; 22-30 gün aralığında tek başına %44.8 iken miks olarak %48.3 oranında bulunmuştur. Garcia ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada *Rotavirüs*'lerin fazla miktarda miks enfeksiyon yaptığı gözlemlenmiş ve bu çalışma ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca dünyada yapılan benzer çalışmalarda *Rotavirüs* görülme aralığı %17.7-27 aralığında tespit edilmiştir (Torsein ve ark., 2011; Bartels ve ark., 2010; Suresh ve ark., 2012; Mayameei ve ark., 2010). Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise *Rotavirüs* %27.45-44.86 aralığında bulunmuştur (Al & Balıkcı 2012; Kaya & Coşkun 2018; Altuğ ve ark., 2013). Yaptığımız çalışma ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalarda bulunan verilerle karşılaştırıldığında oransal olarak benzerdir. Çalışmada neonatal dönem ishallerinde *Rotavirüs*'lerin daha çok miks enfeksiyon olarak katkı sağladığı tespit edildi.

Coronavirüs için yapılan çalışmalar (Torsein ve ark., 2011; Bartels ve ark., 2010; Suresh ve ark., 2012; Mayameei ve ark., 2010) farklı ülkelerde %3.1-6.3 oranı arasında bulunurken ülkemizdeki benzer çalışmalarda

(Altuğ ve ark., 2013; Al & Balıkcı 2012; Kaya & Coşkun 2018) %1.96-13 arasında tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise *Coronavirüs* 'e tek olarak %4, miks olarak ise %9 oranında rastlanılmıştır. Saklı (2017) 'nin Konya'da yapmış olduğu bir çalışmada *Rotavirüs* ve *Coronavirüs* açısından RT-PCR tekniğine göre ve immünokromatografik test kitinin *Rotavirüs* için sensitivitesi %83, spesifitesi %100 bulunurken, *Coronavirüs* için sensitivitesini %76 spesifitesi ise %100 olarak bulmuştur. *Coronavirüs* açısından yaptığı çalışmanın daha önce yapılan araştırmalarla kıyaslandığında düşük çıkmasının sebebinin hastalığın ileri dönemlerindeki yani virüs saçılımının ve viral partikül miktarının düşük olduğu dönemlerde örnekleme yapılmasından kaynaklanabileceğini bildirmiştir (Saklı, 2017). Bu durum, yapılan çalışmalarda farklı oranlar çıkmasının sebebi olarak gösterilebilir.

Torsein ve ark. (2011)'nin İsviçre'de yaptıkları çalışmalarında *Cryptosporidium* %32.4; Kaya ve Coşkun (2018)'un Tokat'ta yapmış oldukları çalışmada %11.21; Kozat & Tuncay (2017)'in Siirt'te yaptıkları çalışmada %10 *Cryptosporidium* bulunmuş bu çalışmada ise tek olarak % 4, miks olarak ise % 7 oranında bulundu. Rakamlar arasında farklılık *Cryptosporidium*'un yaygın olmasında işletmedeki hayvan sayısı, hayvanların yaşı, ishali veya sağlıklı olması, barınak tipi, süt emme durumu, altlık çeşidi, su kaynağı, sürü büyüklüğü, ahır çiftlikteki buzağı sayısı gibi çok risk faktörlerinin rol oynadığı bildirilmektedir (Brook ve ark., 2008; Trotz-Williams ve ark., 2008).

Sonuç

Sivas merkez ve ilçelerinde yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarına göre *Cl. perfringens* %38; *E. coli* %26; *Coronavirüs* %9; *Rotavirüs* %22 ve *Cryptosporidium spp.* %7 oranında tespit edildi. Araştırmamızda kullanılan 138 adet buzağının 27 tanesinde çalışmada araştırılan hiçbir enteropatojene rastlanılmadı. Neonatal dönem buzağı ishallerinde nonenfeksiyöz nedenler ve diğer enteropatojenler de gözardı edilmemelidir. Sivas merkez ve ilçelerinde yaptığımız bu çalışmada ishali buzağılarda en yaygın bulunan etkenler *Cl. perfringens* ve *E. coli* olup ishali buzağuların tedavisinde ve ishalden korunmada bu iki etkenin göz önüne alınması gerektiği sonucuna varıldı. Çalışmamızdaki *E. coli* kaynaklı buzağı ishallerinin hepsi 1-7 gün aralığında bulundu ve bu dönemdeki ishal vakalarında Sivas bölgesinde yaygın tespit ettiğimiz *E. coli*'nin yapılacak tedavi ve proflaksilerde göz önüne alınması gerektiği sonucuna varıldı.

Teşekkür: Bu çalışma Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından desteklenmiştir (CÜBAP Proje No: V-059). Ayrıca, bu makale Canan Caner Külüğ'in yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Kaynaklar

Al M ve Balıkcı E (2012) Neonatal İshalli Buzağılarda Rotavirüs, Coronavirüs, E.coli K99 ve Cryptosporidium Parvum'un Hızlı Test Kitleri ile Teşhisi ve Enteropatojen ile Maternal İmmünite İlişkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi 26(2):73-7.

Altuğ N, Yüksek N, Özkan C, Keleş İ, Başbuğan Y, Ağaoğlu Z, Akgül Y (2013) Neonatal Buzağı İshallerinin İmmunokromotografik Test Kitleri İle Hızlı Etiyolojik Teşhisi. YYU Veteriner Fakültesi Dergisi 24(3):123-128.

Bartels C, Holzhauer M, Jorritsma R, Swart W, Lam T (2010) Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. Prev Vet Med 93:162-169.

Başoğlu A, Şen İ, Sevinç M, Şimşek A (2004) Serum Concentrations of Tumor Necrosis Factor- α in Neonatal Calves with Presumed Septicemia. Journal of Veterinary Internal Medicine 18(2):238-241.

Brook E, Hart A, French N, Christley R (2008) Prevalence and risk factors for Cryptosporidium spp. infection in young calves. Veterinary Parasitology 152(2):46-52.

Cho Y, & Kyoung J (2014) An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. J Vet Sci 15(1):1-17.

De la Fuente R, Garcia A, Ruiz-Santa-Quiteria J, Luzon M, Cid D, Garcia S, Gómez-Bautista M (1998) Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. Preventive Veterinary Medicine 36(2):145-152.

Eman MN and Mona AM (2007) Studies on Diarrhea in Calves with Emphasis on the Role of Clostridium Perfringens and Escherichia Coli. Research Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2: 28-33

Garcia A, Ruiz-Santa-Quiteria J, Orden J, Cid D, Sanz R, Gomez-Bautista M, De La Fuente R (2000) Rotavirüs and concurrent infections with other. Comparative Immunology Microbiology 23:175-183.

Güneş V, Ünver A, Çitil M, Erdoğan H M (2004) Kars Yöresi Neonatal Buzağı İshallerinde Escherichia Coli Serotip O157 ve Clostridium perfringens Tip A Toksini. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 10(1):41-45

Güzelbekteş H, Coşkun A, Sen I (2007) Relationship Of Dehydration Degree With Base Excess And Anion Gap In Dehydrated Calves With Diarrhea. Bull Vet Inst Pulawy 51(1):83-87.

Kaya U ve Coşkun A (2018) Tokat Bölgesindeki Neonatal Buzağı İshallerinin Etiyolojisinin Belirlenmesi, Manas Journal of Agr Vet Life Sci 8 (1): 75 - 80.

Khan A and Khan M (1991) Aetiopathology of Neonatal Calf Mortality. Medical Journal of World Acad Sci 4(2):159-165.

Kozat S and Tuncay İ (2017) Prevalance of Rotavirüs , Coronavirüs , Cryptosporidium spp., Escherichia coli K 99 and Giardia lamblia pathogens in neonatalcalves with diarrheic in Siirt Region. Veterinary Journal 29(1):17-22.

Langoni H, Linhares A, De Avila F, Da Silva A, Elias A (2004) Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. Braz J Vet Res Anim Sci 41(5) 313-319.

Lorenz I, Fagan J, More S (2011a) Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. Irish Veterinary Journal 64(1):9

Lorenz I, Mee J, Earley B, More S (2011b) Calf health from birth to weaning. I. General aspects of disease prevention. Irish Veterinary Journal 64(1):10.

Mayameci A, Mohammadi G, Yavari S, Afshari E, Omid A (2010) Evaluation of relationship between Rotavirüs . Comp Clin Pathol 19:553-557.

Özkan C ve Akgül Y (2004) Neonatal İshalli Buzağılarda Hematolojik, Biyokimyasal ve Elektrokardiyografik Bulgular. YYU Vet Fak Derg 15 (1-2):123-129.

Radostits O, Gay C, Hinchcliff K, Constable P (2007) Veterinary Medicine E-Book: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Elsevier Saunders, New York.

Roy J (1980) Factors Affecting Susceptibility of Calves to Disease. Journal of Dairy Science Volume 63(4): 650-664.

Saklı UG (2017) İshalli buzağı dışkılarında sığır Coronavirüs'u ve sığır Rotavirüs'unun hızlı tanı kiti ve RT-PCR ile araştırılması. Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Konya

Selim AM, Elhaig MM, Zakaria I, Ali A (2017) Bacteriological and molecular studies of Clostridium perfringens infections in newly born calves. Trop Anim Health Prod 49:201-205.

Suresh T, Rai R, Dhama K, Sawant P, Sharma A (2012) Prevalence of Rotavirus, Coronavirus And Escherichia coli. Veterinary Practitioner 13(2):160-165.

Şentürk S (2006). Olgu Tartışmalı Buzağuların İç Hastalıkları. Özsan Matbaacılık, Bursa

Torsein M, Lindberg A, Sandgren C, Waller K, Törnquist M, Svensson C (2011) Risk factors for calf mortality in large Swedish dairy herds. Preventive Veterinary Medicine 99:136-147.

Trotz-Williams L, Martin S, Leslie K, Duffield T, Nydam D, Peregrine A (2008) Association between management practices and within-herd prevalence of Cryptosporidium parvum shedding on dairy farms in southern Ontario. Preventive Veterinary Medicine 83(1): 11-23.

Turgut K ve Ok M. (1997). Veteriner Gastroentereoloji Semptomdan Teşhise. Bahçıvanlar Basım AŞ, Konya



Tick-borne Pathogens in Small Ruminants in Turkey: A Systematic Review

Mehmet Fatih Aydın^{1*}, Nazir Dumanlı^{2,3}

¹ Department of Public Health, Faculty of Health Sciences, University of Karamanoglu Mehmetbey, TR-70100 Karaman, TURKEY

² Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, TR-23119 Elazığ, TURKEY

³ Faculty of Veterinary Medicine, Kyrgyz-Turkish Manas University, 720044, Bishkek, KYRGYZSTAN

*Corresponding Author's E-Mail: veterinermf@gmail.com

Abstract

Ticks and tick-borne diseases cause significant problems while raising livestock. Tick-borne diseases have increased in Turkey during recent years because Turkey has suitable climatic conditions and a large-variety animal population. Sheep and goat farming form a substantial part of the national economy. The main tick-transmitted pathogens in small ruminants in Turkey are *Babesia ovis*, *B. motasi*, *B. crassa*, *Babesia* sp., *Theileria ovis*, *T. uilenbergi*, *T. luwenshuni*, *Theileria* sp. MK, *Theileria* sp. OT1, *Theileria* sp. OT3, *Anaplasma ovis*, and *A. phagocytophilum*. The major tick-transmitted pathogens in sheep and goats in terms of geographic region, province, host, number of animals examined, sampling technique, sampling year, and diagnosis method are summarized chronologically in this review, and we present the current situation in Turkey.

Received 22 May 2019

Received in revised form 24 June 2019

Accepted 18 July 2019

Key words:

Tick, pathogen, sheep, goat, Turkey

Cite this article: Aydın MF, Dumanlı N (2019)

Tick-borne pathogens in small ruminants in Turkey: A systematic review. Turk Vet J, 1(2): 74-83.

Türkiye'deki Küçük Ruminantlarda Kene ile Bulaşan Patojenler: Sistematik Bir Derleme

Özet

Keneler ve kene kaynaklı hastalıklar hayvan yetiştiriciliği açısından önemli sorunlara neden olmaktadır. Türkiye uygun iklim koşullarına ve çok çeşitli hayvan nüfusuna sahip olduğundan, son yıllarda Türkiye'de kene kaynaklı hastalıklar artmıştır. Koyun ve keçi yetiştiriciliği, ulusal ekonomide önemli bir yer tutmaktadır. Türkiye'deki küçük ruminantlarda kene ile nakledilen başlıca patojenler; *Babesia ovis*, *B. motasi*, *B. crassa*, *Babesia* sp., *Theileria ovis*, *T. uilenbergi*, *T. luwenshuni*, *Theileria* sp. MK, *Theileria* sp. OT1, *Theileria* sp. OT3, *Anaplasma ovis* ve *A. phagocytophilum*'dur. Coğrafik bölge, il, konak, incelenen hayvan sayısı, örnekleme tekniği, örnekleme yılı ve teşhis metodu açısından koyun ve keçilere kene ile bulaşan önemli patojenler kronolojik olarak özetlenmiş ve Türkiye'deki mevcut durum sunulmuştur.

Anahtar Sözcükler: Kene, patojen, koyun, keçi, Türkiye

Introduction

Tick-borne diseases (TBDs) are major factors that restrict the development of animal husbandry worldwide, especially in tropical and subtropical areas where reservoir, pathogen, vector, and host distribution overlap. They have an impact on multifarious domestic and wild animals, and most are considered as neglected and/or emerging zoonosis (Gray et al., 2009). In recent years, as well as across the globe, some tick-borne diseases have increased in Turkey (Inci et al., 2016). Climate change and the migration of birds are the main reasons for this increase (Estrada-Peña et al., 2012).

Turkey, located in Eurasia at 36.42 latitude and 26.45 longitude, has a surface area of 780.576 km² with a population of about 82 million people. According to the Turkish Statistical Institute, there were 17 million cattle, 35 million sheep, and 11 million goats in the country in 2018 (Anonymous, 2018). Agriculture and livestock production activities form a substantial part of the national economy. There are seven geographic regions in the country: Black Sea, Central Anatolia, Eastern Anatolia, Southeastern Anatolia, Aegean, Marmara, and Mediterranean. Because the country is spread across a

wide area, and there are noticeably differing climates for the seven regions. From the coastal regions, Marmara, Aegean, and Mediterranean have a Mediterranean climate, and the Black Sea region has a temperate oceanic climate. In general, a continental climate is predominant in the other regions.

Major TBDs caused by *Theileria*, *Babesia* and *Anaplasma* species in sheep and goats occur across the country (Altay et al., 2007a; 2007b; Aydın et al., 2013; Karagenc, 2017; Bilgic et al., 2017). Because tick infestation in small ruminants is common in all geographic regions of Turkey (Aydın et al., 2012; Dumanlı et al., 2012).

Theileria/Babesia protozoan and *Anaplasma/Ehrlichia* bacteria species are tick-transmitted pathogens, which cause subclinical and clinical infections in a wide range of domestic and wild animals, and also in humans (de la Fuente et al., 2008). Animals become carriers after acute infections, and these animals become a source of infection. There have been several investigations aimed to determine the carrier animals (Altay et al., 2007a; Ekici et al., 2012; Aydın et al., 2013). Furthermore, the detection of agents in ticks can provide significant data for the circulation of the pathogen in the field (Aydın et al., 2015). Ovine and caprine haemoparasite species and isolates comprise *Theileria lestoquardi* (*T. hirci*), *T. uilenbergi* (*Theileria* sp. China 2), *T. luwenshuni* (*Theileria* sp. China 1) (Yin et al., 2007), *T. ovis*, *T. separata*, *T. recondite*, *Theileria* sp. OT1, *Theileria* sp. OT3, *Theileria* sp. MK (Altay et al., 2007a), *Babesia ovis*, *B. motasi*, *B. crassa*, *B. taylori*, *B. foliata*, *Babesia* sp. Xinjiang (Liu et al., 2007; Guan et al., 2009), *Babesia* sp. BQ1, *Babesia* sp. (Ozubek & Aktas, 2017a), *Anaplasma ovis*, *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia ruminantium*, *E. ovina*, and *Ehrlichia* sp. Omatjenne until now (Stuen, 2017). From these, *T. lestoquardi*, *T. luwenshuni*, *T. uilenbergi*, *B. ovis*, *B. motasi*, and *A. phagocytophilum* are accepted to be pathogenic. *T. ovis*, *T. separata*, *T. recondite*, *B. crassa*, *Babesia* sp. Xinjiang, and *A. ovis* are considered to be low or non-pathogenic for small ruminants under normal conditions (Liu et al., 2007; Stuen, 2017). *B. foliata* (Ray & Raghavachari, 1941) and *B. taylori* (Sarwar, 1935) were defined nearly a century ago, they have not been reported since so their existence today is questionable (Uilenberg, 2006).

The diagnosis of acute hemoparasitic infections is performed by clinical and microscopic examination (ME) of thin blood and lymph smears (Sevinc et al., 2018). However, species discrimination and determining

low parasitemia is not always possible with ME (Ozubek & Aktas, 2017b). After acute infections, animals become carriers and the detection of the agents with ME is not possible owing to low parasitemia. Serologic tests have been used for this purpose for a long time (Dumanlı et al., 1997; Ekici et al., 2012). However, cross- reactions between species and false-negative results are potential restrictions. Molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR), reverse line blotting (RLB), and sequencing have a broad usage area for TBDs (Bilgic et al., 2017).

Geographic distribution and prevalence

Babesia ovis

According to Goksu (1967), *B. ovis* was first determined in small ruminants in 1889 microscopically by Laveran and Nicolle. Then, it was detected in sheep in Istanbul in 1912 by Hakki, in Bursa in 1930 by Abravanel and Raif, in Ankara in 1931 by Ekrem, again in Bursa in 1931 by Lestoquard and Ekrem, in Central Anatolia region in 1936 by Nevzad through ME and clinical examination. Kurtpinar detected babesiosis using ME and clinical examination in 52 sheep and 11 goats, and Ozcan found it in 11 sheep in Ankara between 1950 and 1951 in the summer months (Goksu, 1967). Goksu (1967) examined 520 suspected and 313 healthy small ruminants from the provinces of Central and Eastern Anatolia regions in 1960-1961. *B. ovis* was detected using ME in suspected and healthy animals at 24.82% and 0.95%, respectively. Hoffmann et al. (1971) detected *B. ovis* as 3.1% in 258 healthy sheep and goats from Adana, Amasya, Ankara, Bursa, Cankiri, Malatya, and Gaziantep provinces using ME between 1967 and 1970. A study performed by Guralp et al. (1975) on 277 healthy sheep from Balikesir, Kırklareli, and Tekirdag provinces of the Marmara region using ME and demonstrated that the prevalence was 0.36%. Tasci (1989) investigated 3878 healthy sheep from the Van province of the Eastern Anatolia region using ME in 1987-1988 and detected babesiosis as 0.85%. It was indicated that some samples were positive for *B. ovis*. Ozer et al. (1993) found *B. ovis* microscopically in healthy sheep and goats as 0.6% in the Malatya, Adiyaman, Sanliurfa, Mardin, and Diyarbakir provinces of the Eastern and Southeastern Anatolia regions in a study of 500 animals in 1988-1989. Inci et al. (1998) found the prevalence as 25.25% using ME on 194 healthy small ruminants in the Cankiri province in 1996. Inci et al. (2002) also stated that the prevalence was 15.48% with ME in small ruminants in the Kayseri province of Central Anatolia

region according to a study conducted on 239 animals between 1998 and 2000.

Ozkoc (1979) investigated *B. ovis* in sheep with serologic tests for the first time in Turkey. According to Duzlu et al. (2012), Ozkoc's study had the characteristic of being the first serologic study for TBDs in small ruminants in Turkey. Deger (1990) investigated 303 healthy sheep from the Van province using ME and serologic tests and its prevalence was 30.6% and 60.3%, respectively. A high prevalence was also found in healthy sheep by Cakmak et al. (1991) in the Samsun province located in the Black Sea region using ME and serologic tests; its prevalence among 141 sheep that were investigated was 67.37% and 71.63% with ME and serologic tests, respectively. Duzgun et al. (1991) investigated 1466 healthy sheep from 16 provinces (Adana, Bursa, Edirne, Istanbul, Samsun, Afyon, Amasya, Ankara, Kirsehir, Sivas, Bingol, Diyarbakir, Elazig, Kars, Sanliurfa, and Van) of all geographic regions of Turkey using serologic tests and they found that the prevalence was 74.4% in total. Sevinc and Dik (1996) examined 723 clinically healthy sheep from the Konya province of the Central Anatolia region and they found the prevalence as 11.47% and 42.14% using ME and serologic tests, respectively. Duzgun (1997) performed a serologic investigation on 360 healthy sheep in the Canakkale province of the Marmara region and found its prevalence ranged between 35% and 63.3% between 1996 and 1997. Sayin et al. (1997) investigated 452 healthy sheep from the Samsun, Izmir, Ankara, Kirsehir, and Erzurum provinces of the Black Sea, Central Anatolia, Aegean, and Eastern Anatolia regions, and they found the seroprevalence as 69.02% in total. According to a study performed by Dumanli et al. (1997) on 331 healthy sheep in the Elazig province of Eastern Anatolia, the seroprevalence was 45.0%. Bicek (2001) examined 156 healthy sheep from the Van province in 1998 and found its prevalence as 16.02% and 45.51% using ME and serologic tests, respectively. Emre et al. (2001) investigated 607 healthy sheep in the Sanliurfa province of the Southeastern Anatolia region between 1997 and 1998 and they found the prevalence as 1.82% and 41.02% using ME and serologic tests, respectively. Aktas et al. (2001) investigated 220 healthy sheep from the Malatya province in 1998 and it was determined that its prevalence was 1.8% and 55.9% using ME and serologic investigations, respectively. Karatepe et al. (2003) examined 1200 healthy sheep in the Nigde province in 1999-2000 and they found the prevalence as 24.75% and 53.75% using ME and the serologic method, respectively. Cicek et al. (2004) found

its prevalence as 0.49% and 51.96%, also with ME and serologic testing in healthy sheep in the Afyon province of the Aegean region according to a study conducted on 204 animals in 2000. Karatepe et al. (2005) investigated 91 healthy sheep in the Amasya province of the Black Sea region in 1999 and its prevalence was 35.16% and 38.46% according to ME and serologic tests. The *B. ovis* seroprevalence was 42.15% in the Konya province of the Central Anatolia region in a study conducted by Ekici et al. (2012) on 2000 healthy sheep in 2010-2011.

The first molecular study about TBDs in small ruminants in Turkey was performed by Aktas et al. (2005a). They investigated 98 healthy small ruminants from the Elazig province of the Eastern Anatolia region and determined the prevalence as 4.08% and 21.42% with ME and species-specific PCR, respectively. Sarayli et al. (2006) investigated 300 healthy small ruminants from the Kayseri province of the Central Anatolia region and they found its prevalence was 3.0% and 3.7% using ME and RLB. Altay et al. (2007a) also investigated 920 healthy sheep and goats from the Eastern Anatolia region in 2005-2006 and its prevalence was 5.43% with RLB in this study. Also, DNA sequence confirmation was first made for TBDs in small ruminants in Turkey. Aktas et al. (2007) examined 400 healthy small ruminants from eight provinces (Malatya, Mus, Elazig, Erzincan, Erzurum, Igridir, Mardin, and Diyarbakir) of the Eastern and Southeastern Anatolia regions and the prevalence was 1.5% and 8.25% in ME and species-specific PCR. Kocabeyoglu (2009) examined 300 healthy goats from the Kahramanmaraş province of the Mediterranean region and the prevalence was 0.33% and 1.33% with ME and RLB. Inci et al. (2010) performed a study on 573 healthy small ruminants between 2006 and 2008 in the Kayseri, Sivas, and Yozgat provinces of the Central Anatolia region and its prevalence was found as 2.6% using RLB. Sevinc et al. (2013) examined 850 sheep in the Konya province in 2011 and 14.35% were positive in ME. Although all the microscopically positive samples were also positive with PCR, 38.14% of the samples were found to be positive in serologic tests. According to a study conducted on 1128 healthy small ruminants in the Bolu, Kastamonu, Corum, Samsun, Tokat, Giresun and Bayburt provinces of the Black Sea region in 2010-2011 by Aydın et al. (2013), the prevalence of *B. ovis* was found as 0.44% using RLB. Bilgic et al. (2017) performed a study on 1979 healthy small ruminants from 18 provinces (Adana, Afyon, Aksaray, Antalya, Aydın, Burdur, Denizli, Isparta, Izmir, Konya, Kutahya, Manisa, Mugla, Nigde, Sirnak, Sanliurfa, Usak, Van) of the Aegean,

Mediterranean, Central Anatolia, Eastern Anatolia, and Southeastern Anatolia regions between 2011 and 2013, and they found the prevalence was 4.9% with species-specific PCR and 0.4% with RLB. Kose (2017) detected it with RLB at a rate of 0.31% in 630 healthy sheep and goats in the Burdur province of the Mediterranean region in 2015. The prevalence was 5.2% with species-specific PCR in the Konya and Karaman provinces of the Central Anatolia region in a study by Zhou et al. (2017) on 343 healthy sheep and goats in 2010-2011. Ozubek and Aktas examined 200 healthy small ruminants from the Mersin province (2017a) and 590 healthy and suspected small ruminants from the Adana, Gaziantep and Adıyaman provinces (2017b) between 2013 and 2015 and its prevalence was determined as 2.0% and 5.4% using RLB, respectively. Sevinc et al. (2018) investigated 209 sheep with clinical signs suggestive of babesiosis in the Konya and Karaman provinces of the Central Anatolia region in 2015-2016 and the prevalence was 70.81% with species-specific PCR.

Babesia motasi

Babesia motasi was microscopically and molecularly identified in Turkey. According to Goksu (1967) it was detected in Ankara by Nevzat, 1936, in the Mediterranean region by Noyan, 1954, in the Erzurum, Kars, and Agri provinces by Kurtpinar, 1956, in healthy sheep using ME. Its prevalence was found as 12.0% in Ankara using ME in healthy sheep by Ozcan (1961). Goksu (1967) detected it in clinically suspected sheep at a rate of 1.73% in Central and Eastern Anatolia regions. Tasci (1989) also detected it in the Van province using ME.

The presence of *B. motasi* in Turkey was questionable until quite recently because it had not been confirmed molecularly. However, it was defined in small ruminants in Turkey at a rate of 0.1% using RLB in the Mugla province of the Aegean region by Bilgic et al. (2017).

Babesia crassa

It has been suggested that this species is present in Turkey in a study conducted using molecular methods (Schnittger et al., 2003) and it was recently identified in small ruminants in the Aegean, Mediterranean, Central, East, and Southeastern Anatolia regions of Turkey by Bilgic et al. (2017) and by Kose (2017) at rates of 4.0% and 6.19%, respectively, using RLB.

Theileria ovis

The first evidence for *T. recondita* (syn: *T. ovis*) in Turkey comes from the study performed by Lestoquard

and Ekrem, 1931, on sheep in the Bursa province of the Marmara region by ME. It was also detected microscopically on clinically suspected and healthy small ruminants with rates of 18.26% and 52.71% in Central and Eastern Anatolia regions according to Goksu (1967). Hoffmann et al. (1971) determined *T. ovis* with ME in healthy small ruminants from the Adana, Amasya, Ankara, and Bursa provinces at a rate of 3.1%. *T. recondita* (syn: *T. ovis*) was also detected microscopically in healthy sheep from the Marmara region at a rate of 1.44% by Guralp et al. (1975).

Between 1993 and 2005, limited articles were published in which *Theileria* spp. was diagnosed using ME (Ozer et al., 1993; Inci et al., 1998; 2003; Aktas et al., 2005b), and with genus-specific PCR (Aktas et al., 2005b); however, species discrimination was not performed. The microscopic prevalence of *Theileria* spp. was between 7.4% and 18.4% in these studies, and the molecular prevalence was 41.2%.

There was only one study aimed at determining *T. ovis* using serologic tests in Turkey (Sayin et al., 2009). The authors investigated 776 healthy small ruminants from the Ankara, Aksaray, Cankiri, Elazig, Van, Bingol and Mersin provinces between 1997 and 1999 and its prevalence was found as 33.89% and 54.38% in ME and serological investigations.

The first molecular study for *T. ovis* in small ruminants in Turkey was conducted by Altay et al. (2005) on 124 healthy sheep from the Eastern Anatolia region. Its prevalence was 19.35% and 54.03% using ME and species-specific PCR in this study. Aktas et al. (2005b) examined 164 healthy small ruminants from the Elazig province of the Eastern Anatolia region in 2004 and they found the prevalence as 24.39% and 43.29% using ME and species-specific PCR, respectively. Altay et al. (2007b) also found that the prevalence was 15.60% and 50.55% using the same methods in a study conducted on 819 small ruminants from the Malatya, Mus, Erzincan, Erzurum, Iğdir, Diyarbakir, and Mardin provinces. The prevalence with RLB was 37.6% in sheep and goats in the Kayseri province of the Central Anatolia region (Sarayli et al., 2006); 34.56% in sheep and goats in the Eastern Anatolia region (Altay et al., 2007a); 0.33% in goats in the Kahramanmaraş province of the Mediterranean region (Kocabeyoglu, 2009); 33.9% in sheep and goats in the Kayseri, Sivas and Yozgat provinces of the Central Anatolia region (Inci et al., 2010); 18.90% (Altay et al., 2012) and 28.99% (Aydın et al., 2013) in sheep and goats in the Black Sea region; 60.00% in a total 18 provinces of the Aegean,

Mediterranean, Central, Eastern and Southeastern Anatolia regions (Bilgic et al., 2017); 41.90% in sheep and goats in the Burdur province of the Mediterranean region (Kose, 2017); 39.16% in sheep and goats in the Sivas province of the Central Anatolia region (Altay et al., 2017); 17.0% in sheep and goats in the Mersin province of the Mediterranean region (Ozubek & Aktas, 2017a); and 35.4% in sheep and goats in the Adana, Gaziantep, and Adiyaman provinces (Ozubek & Aktas 2017b). According to recent articles, its prevalence with species-specific PCR in healthy small ruminants was 61.4% (Bilgic et al., 2017) in 18 provinces of Turkey and 35.9% (Zhou et al., 2017) in the Konya and Karaman provinces.

***Theileria lestoquardi* (*Theileria hirci*)**

This species was only reported in goats as assessed using ME from the Cankiri, Malatya, and Gaziantep provinces in October/November as 16.9% by Hoffmann et al. (1971). However, according to the results of many studies made with molecular techniques, this species has not been found in Turkey.

Theileria luwenshuni* and *Theileria uilenbergi

T. luwenshuni and *T. uilenbergi* were recently detected in healthy small ruminants via PCR and RLB by Bilgic et al. (2017). The prevalence of *T. luwenshuni* was detected as 7.52% and 0.05% with PCR and RLB respectively, and 6.46% and 0.5% of the animals were found to be positive in terms of *T. uilenbergi* with PCR and RLB.

Unidentified *Theileria* and *Babesia* species or isolates

In 2007 a new *Theileria* isolate was discovered in small ruminants in Turkey according to 18 S rRNA gene analysis by Altay et al. (2007a). It was named as *Theileria* sp. MK and its prevalence was 1.30% in the Eastern Anatolia region. This new genotype was detected in healthy small ruminants in the Black Sea region at a rate of 0.99% (Altay et al., 2012) and 0.62% (Aydın et al., 2013) in RLB. *Theileria* sp. MK was also determined in sheep and goats by Bilgic et al. (2017), Altay et al. (2017) and Ozubek and Aktas (2017b) at rates of 0.4%, 2.59%, and 0.3%, respectively, using RLB. *Theileria* sp. OT1 (Bilgic et al., 2017) and *Theileria* sp. OT3 (Altay et al., 2007a; Altay et al., 2012; Aydın et al., 2013; Bilgic et al., 2017; Altay et al., 2017) are the other identified isolates in healthy sheep and goats in the Eastern Anatolia, Black Sea, and Central Anatolia regions.

In a recent study by Ozubek and Aktas (2017a), a new *Babesia* isolate, which was provisionally designated

Babesia sp., showing the highest diversity with other *Babesia* species according to 18S rRNA gene analysis, was detected in goats at a rate of 5.74% in the Mersin province.

Theileria annulata

T. annulata was detected in sheep and goats from the Adana, Gaziantep, and Adiyaman provinces using RLB and nested PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) at a total rate of 3.9% (Ozubek & Aktas, 2017b).

Anaplasma ovis

A. ovis was first determined in Turkey using ME in sheep by Ekrem in 1931, and in sheep from Bursa by Lestoquard and Ekrem in 1931 (Goksu, 1967). Goksu (1967) detected it in clinically suspected and healthy sheep and goats at rates of 1.34% and 2.23% in the Central Anatolia and Eastern Anatolia regions using ME. Hoffmann et al. (1971) reported that two goats were infected with *Anaplasma* spp. as assessed using ME in the Mediterranean region. According to Guralp et al. (1975), its microscopic prevalence in healthy sheep from the Balikesir, Kirklareli, and Tekirdag provinces was 0.72%. Ozer et al. (1993) also microscopically detected it in healthy sheep and goats from the Malatya, Adiyaman, Sanliurfa, Mardin, and Diyarbakir provinces at a rate of 0.2%.

After 2013, molecular based studies were conducted to determine the actual prevalence of *A. ovis* in small ruminants. According to an investigation of 830 healthy sheep from the Aydin, Mugla, Denizli, Burdur, Usak, Aksaray, Konya, Van, and Sanliurfa provinces using species-specific PCR, the prevalence was 31.4% in total (Renneker et al., 2013). Altay et al. (2014) examined 422 healthy sheep and goats from the Bingol, Elazig, Malatya, and Mus provinces using PCR and they found that 67.06% of samples were positive. Its molecular prevalence was 50.83% in sheep and goats in the Marmara region according to a study conducted on 423 animals from Istanbul, Tekirdag, Edirne, and Kirklareli provinces (Oter et al., 2016).

Ekici (2016) performed a serologic survey on 832 healthy sheep and goats from Konya and Karaman provinces, and the prevalence was determined as 10.0% and 75.12% using ME and serologic tests.

Bilgic et al. (2017) stated that its prevalence was 63.3% in healthy small ruminants in species-specific PCR, this rate was 60.0% in the Konya and Karaman provinces (Zhou et al., 2017), and 18.0% in the Adana, Mersin,

Table 1. Tick-borne pathogens (TBPs) in small ruminants in Turkey; the prevalence, the diagnostic methods and the references.

<i>Species</i>	<i>Method</i>	<i>Prevalence (%)</i>	<i>Reference</i>
<i>Babesia ovis</i>	ME	0.36-67.37	Goksu, 1967; Hoffmann et al., 1971; Guralp et al., 1975; Tasci, 1989; Ozer et al., 1993; Inci et al., 1998; 2002; Deger, 1990; Cakmak et al., 1991; Sevinc & Dik, 1996; Bicek, 2001; Emre et al., 2001; Aktas et al., 2001; 2005a; 2007; Karatepe et al., 2003; 2005; Cicek et al., 2004; Sarayli et al., 2006; ; Kocabeyoglu, 2009; Sevinc et al., 2013
	SM	38.46-74.4	Ozkoc, 1979; Deger, 1990; Cakmak et al., 1991; Duzgun et al., 1991; Sevinc & Dik, 1996; Duzgun, 1997; Sayin et al., 1997; Dumanli et al., 1997; Bicek, 2001; Emre et al., 2001; Aktas et al., 2001; Karatepe et al., 2003; 2005; Cicek et al., 2004; Ekici et al., 2012; Sevinc et al., 2013
	MT	0.31-21.42	Aktas et al., 2005a; 2007; Sarayli et al., 2006; Altay et al., 2007a; Kocabeyoglu, 2009; Inci et al., 2010; Sevinc et al., 2013; 2018; Aydın et al., 2013; Bilgic et al., 2017; Kose, 2017; Zhou et al., 2017; Ozubek & Aktas, 2017a; 2017b
<i>Babesia motasi</i>	ME	1.73-12.0	Goksu, 1967; Ozcan, 1961; Tasci, 1989
	MT	0.1	Bilgic et al., 2017
<i>Babesia crassa</i>	MT	4.0-6.19	Schnittger et al., 2003; Bilgic et al., 2017; Kose, 2017
<i>Babesia sp.</i>	MT	5.74	Ozubek & Aktas, 2017a
<i>Theileria ovis</i>	ME	1.44-52.71	Goksu, 1967; Hoffmann et al., 1971; Guralp et al., 1975; Sayin et al., 2009; Altay et al., 2005; 2007b; Aktas et al., 2005b
	SM	54.38	Sayin et al., 2009
	MT	0.33-61.4	Altay et al., 2005; 2007a; 2007b; 2012; 2017; Aktas et al., 2005b; Sarayli et al., 2006; Kocabeyoglu, 2009; Inci et al., 2010; Aydın et al., 2013; Bilgic et al., 2017; Kose, 2017; Ozubek & Aktas, 2017a; 2017b; Zhou et al., 2017
<i>Theileria lestoquardi</i>	ME	16.9	Hoffmann et al., 1971
<i>Theileria uilenbergi</i>	MT	6.46	Bilgic et al., 2017
<i>Theileria luwenshuni</i>	MT	7.52	Bilgic et al., 2017
<i>Theileria annulata</i>	MT	3.9	Ozubek & Aktas, 2017b
<i>Theileria sp. MK</i>	MT	0.3-2.59	Altay et al., 2007a; 2012; 2017; Aydın et al., 2013; Bilgic et al., 2017; Ozubek & Aktas, 2017b
<i>Theileria sp. OT1</i>	MT	2.6	Bilgic et al., 2017
<i>Theileria sp. OT3</i>	MT	0.2-3.24	Altay et al., 2007a; 2012; 2017; Aydın et al., 2013; Bilgic et al., 2017
<i>Anaplasma ovis</i>	ME	0.2-10.0	Goksu, 1967; Hoffmann et al., 1971; Guralp et al., 1975; Ozer et al., 1993; Ekici, 2016
	SM	75.12	Ekici, 2016
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	MT	18.0-67.06	Renneker et al., 2013; Altay et al., 2014; Oter et al., 2016; Bilgic et al., 2017; Zhou et al., 2017; Aktas & Ozubek, 2018; Sevinc et al., 2018
	ME	9.86	Gokce et al., 2008
	SM	14.86-21.3	Unver et al., 2005; Gokce et al., 2008; Ekici, 2016
	MT	1.56-19.66	Gokce et al., 2008; Altay et al., 2014; Atas et al., 2016; Oter et al., 2016; Bilgic et al., 2017; Sevinc et al., 2018

Abbreviations: ME, microscopic examination; SM, serologic method; MT, molecular techniques.

Gaziantep, and Adiyaman provinces (Aktas & Ozubek 2018). Sevinc et al. (2018) also found that *A. ovis* was present at a rate of 56.94% in sheep with clinical signs suggestive of babesiosis in the Konya and Karaman provinces.

Anaplasma phagocytophilum

Preliminary data for *A. phagocytophilum* in small ruminants was provided from a serologic survey conducted on 104 healthy sheep from the Kars province by Unver et al. (2005). The seroprevalence was 19.2% in that study. Gokce et al. (2008) investigated its prevalence with ME, serologic tests, and PCR in 750 healthy sheep from the Artvin, Rize, Trabzon, Giresun, Ordu, and Samsun provinces, and the prevalence was 9.86%, 14.86%, and 12.35% with these methods respectively. Its prevalence in species-specific PCR varied between 1.56% and 19.66% in Turkey. Altay et al. (2014) found it as 19.66% in Bingol, Elazig, Malatya, and Mus, whereas its prevalence was 4.33% in Sanliurfa (Atas et al., 2016), 8.51% in Istanbul, Tekirdag, Edirne, and Kirklareli (Oter et al., 2016), 1.56% in 18 provinces of Turkey (Bilgic et al., 2017), and 2.39% in Konya and Karaman (Sevinc et al., 2018). According to a recent serologic investigation in Konya and Karaman, its prevalence was 21.3% (Ekici, 2016).

Conclusion

Studies about tick-borne protozoan and bacterial infections in sheep and goats in Turkey were summarized with this review (Table 1). The prevalence of tick-transmitted pathogens in healthy sheep and goats was 0.36-67.37% (ME), 38.46-74.4% (serologic methods), 0.31-21.42% (molecular techniques) for *B. ovis*; 1.73-12.0% (ME), and 0.1% (molecular techniques) for *B. motasi*; 4.0-6.19% (molecular techniques) for *B. crassa*; 5.74% (molecular techniques) for *Babesia* sp.; 1.44-52.71% (ME), 54.38% (serologic method), 0.33-61.4% (molecular techniques) for *T. ovis*; 7.52% (molecular techniques) for *T. luwenshuni*; 6.46% (molecular techniques) for *T. uilenbergi*; 0.3-2.59% (molecular techniques) for *Theileria* sp. MK.; 2.6% (molecular techniques) for *Theileria* sp. OT1; 0.2-3.24% (molecular techniques) for *Theileria* sp. OT3; 3.9% (molecular techniques) for *T. annulata*, 0.2-10.0% (ME); 75.12% (serologic method); 18.0-67.06% (molecular techniques) for *A. ovis*; and 9.86% (ME), 14.86-21.3% (serologic method), 1.56-19.66% (molecular techniques) for *A. phagocytophilum*.

As a conclusion, *B. ovis* has a broad range of distribution and low prevalence, *T. ovis* has a broad

range of distribution and also a high prevalence. Presence of *B. motasi*, *B. crassa*, *T. luwenshuni* and *T. uilenbergi* were recently molecularly confirmed, but need to be investigated in detail. Further investigations should be performed related with the newly identified species / isolates (*Theileria* sp. MK, *Theileria* sp. OT1, *Theileria* sp. OT3, *Babesia* sp. and *T. annulata*) in sheep and goats. According to the limited number of studies about sheep and goat *Anaplasma* infections, *A. ovis* has high prevalence, and *A. phagocytophilum* has low prevalence in sheep and goats in Turkey.

References

- Aktas M and Ozubek S (2018) *Anaplasma ovis* genetic diversity detected by major surface protein 1a and its prevalence in small ruminants. *Vet Microbiol* 217:13-17. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.026>
- Aktas M, Altay K, Dumanli N (2005a) Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of *Babesia ovis* infection in sheep and goats. *Vet Parasitol* 133: 277-281. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.057>
- Aktas M, Altay K, Dumanli N (2005b) Survey of *Theileria* parasites of sheep in eastern Turkey using polymerase chain reaction. *Small Rumin Res* 60:289-293. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.01.002>
- Aktas M, Altay K, Dumanli N (2007) Determination of prevalence and risk factors for infection with *Babesia ovis* in small ruminants from Turkey by polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 100(4):797-802. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0345-2>
- Aktas M, Düzgün A, Babür C (2001) Malatya yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*'in seroprevalansı. *Turk J Vet Anim Sci* 25(3):241-243.
- Altay K, Dumanli N, Holman PJ, Aktas M (2005) Detection of *Theileria ovis* in naturally infected sheep by nested PCR. *Vet Parasitol* 127(2):99-104. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.012>
- Altay K, Dumanli N, Aktas M (2007a) Molecular identification, genetic diversity and distribution of *Theileria* and *Babesia* species infecting small ruminants. *Vet Parasitol* 147:161-165. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.001>
- Altay K, Aktas M, Dumanli N (2007b) *Theileria* infections in small ruminants in the east and southeast Anatolia. *Turkiye Parazitoloj Derg* 31(4):268-271.
- Altay K, Dumanli N, Aktas M (2012) A study on ovine tick-borne hemoprotozoan parasites (*Theileria* and *Babesia*) in the

East Black Sea Region of Turkey. Parasitol Res 111(1): 149-153. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2811-8>.

Altay K, Dumanli N, Aktas M, Ozubek S (2014) Survey of *Anaplasma* infections in small ruminants from east part of Turkey. Kafkas Univ Vet Fak Derg 20(1):1-4. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2013.9189>

Altay K, Atas AD, Ozkan E (2017) Sivas Yöresinde Koyun Keçi ve Kenelerde *Theileria* ve *Babesia* Türlerinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. Manas J Agr Vet Life Sci 7(1):30-39.

Anonymous (2018) Animal Production Statistics. Turkey Statistical Institute Web. <http://tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist>. Accessed 25 April 2019.

Atas M, Dumanli N, Altay K (2016) Şanlıurfa yöresinde koyun ve keçilerde *Anaplasma phagocytophilum*'un moleküler yöntemlerle araştırılması. Manas J Agr Vet Life Sci 6(2):1-8.

Aydın MF, Aktas M, Dumanli N (2012) Tick Infestations on Sheep and Goats in the Black Sea Region of Türkiye. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 18(Suppl-A):A17-A22. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2011.5209>

Aydın MF, Aktas M, Dumanli N (2013) Molecular identificaion of *Theileria* and *Babesia* in sheep and goats in the Black Sea Region of Turkey. Parasitol Res 112(8):2817-2824. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3452-x>

Aydın MF, Aktas M, Dumanli N (2015) Molecular identification of *Theileria* and *Babesia* in ticks collected from sheep and goats in the Black Sea region of Turkey. Parasitol Res 114(1):65-69. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4160-x>

Bicek K and Deger S (2001) Van ve yöresi koyunlarında Babesiosis'in ELISA ile teşhisi. Y Y Üniv Sağ Bil Derg 7:27-31.

Bilgic HB, Bakirci S, Kose O, Unlu AH, Hacilarlıoğlu S, Eren H, Weir W, Karagenc T (2017) Prevalence of tick-borne haemoparasites in small ruminants in Turkey and diagnostic sensitivity of single-PCR and RLB. Parasites & vectors 10(1): 211. <https://doi.org/doi:10.1186/s13071-017-2151-3>

Cakmak A, Dincer S, Karaer Z (1991) Samsun yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*'in serodiagnozu üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 38:242-251.

Cicek H, Duzgun A, Emre Z, Karaer Z (2004) Seroprevalance of *Babesia ovis* in sheep around Afyon. Turk J Vet Anim Sci 28:683-686.

de la Fuente J, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE (2008) Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. Front Biosci 13:6938-6946.

Deger S (1990) Van ilinde koyunlarda babesiosisin seroepidemiolojisi üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara

Dumanli N, Koroglu E, Duzgun A, Angin M, Kucukerden N (1997) Elazığ yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*'in seroprevalansı. Turk J Vet Anim Sci 21:183-186.

Dumanli N, Altay K, Aydın MF (2012) Tick Species of Cattle, Sheep and Goats in Turkey. Türkiye Klinikleri J Vet Sci 3(2): 67-72.

Duzlu O, Yıldırım A, İnci A (2012) Türkiye'de Evcil Ruminantlarda Babesiosis. Türkiye Klinikleri J Vet Sci 3(2): 27-34.

Duzgun A, Wright IG, Waltisbuhl DJ, Gale KR, Goodger BV, Dargie JD, Alabay M, Cerci H (1991) An ELISA for the diagnosis of *Babesia ovis* infection utilizing a synthetic, *Babesia bovis*-derived antigen. Vet Parasitol 39:225-231.

Duzgun A (1997) Çanakkale yöresinde koyunlarda *Babesia ovis*'in seroepidemiolojisi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara

Ekici OD, Sevinc F, Isik N (2012) Instability of ovine babesiosis in an endemic area in Turkey. Vet Parasitol 188:372-375. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.001>

Ekici S (2016) Konya ve Karaman yöresinde koyun ve keçilerde anaplazmozisin yaygınlığı. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya

Emre Z, Duzgun A, İriadam M, Sert H (2001) Seroprevalence of *Babesia ovis* in Awassi sheep in Urfa, Turkey. Turk J Vet Anim Sci 25:759-762.

Estrada-Peña A, Ayllón N, de la Fuente J (2012) Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. Frontiers in physiology 3:64. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00064>

Gokce HI, Genc O, Akca A, Vatanserver Z, Unver A, Erdogan HM (2008) Molecular and serological evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection of farm animals in the Black Sea region of Turkey. Acta Vet Hung 56:281-292.

Goksu K (1967) Yerli koyunlarımızda Babesidae ve Theileridae'lerin epizootiolojik durumlarıyla biyolojilerine dair araştırmalar. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları No:205, Ankara, Turkey

Gray JS, Dautel H, Estrada-Peña A, Kahl O, Lindgren E (2009) Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in europe. Interdiscip Perspect Infect Dis 593232. <https://doi.org/10.1155/2009/593232>

Guan GQ, Ma ML, Moreau E, Liu JL, Lu BY, Bai Q (2009) A new ovine *Babesia* species transmitted by *Hyalomma*

anatolicum anatolicum. Exp Parasitol 122:261-267. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.05.001>

Guralp N, Sayin F, Tigin Y (1975) Texel merinos ve kıvrıkcık koyunları ile melezlerinde görülen parazit türler, bunların enfeksiyon oranları ve savaş çareleri. Ankara Üniv Vet Fak Derg 22:1-7.

Hoffmann G, Horchner F, Schein E, Gerber HC (1971) Seasonal appearance of ticks and piroplasms in domestic animals in the Asiatic provinces of Turkey. [Article in German]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 84:152-156.

Inci A, Yukari BA, Sayin F (1998) Çankırı yöresinde bazı koyun ve keçi sürülerinde babesiosis ve theileriosis etkenlerinin mikroskopik kan muayenesiyle araştırılması. Ankara Üniv Vet Fak Derg 45:105-113.

Inci A, Karaer Z, Ica A (2002) Kayseri Yöresinde Koyun ve Keçilerde Babesiosis. FÜ Sağ Bil Vet Derg 16(1):79-83.

Inci A, Nalbantoglu S, Cam Y, Atasever A, Karaer Z, Cakmak A, Sayin F, Yukari BA, Ica A, Deniz A (2003) Kayseri yöresinde koyun ve keçilerde theileriosis ve kene enfestasyonları. Turk J Vet Anim Sci 27:57-60.

Inci A, Ica A, Yildirim A, Duzlu O (2010) Identification of *Babesia* and *Theileria* species in small ruminants in Central Anatolia (Turkey) via reverse line blotting. Turk J Vet Anim Sci 34(2):205-210.

Inci A, Yildirim A, Duzlu O, Doganay M, Aksoy S (2016) Tick-Borne Diseases in Turkey: A Review Based on One Health Perspective. PLoS Negl Trop Dis 10(12):e0005021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005021>

Karagenc T (2017) Çiftlik hayvanlarında kene kaynaklı önemli kan parazitleri ve bunların Türkiye'deki yaygınlığı. In Abstracts 20. Ulusal Parazitoloji Kongresi. Eskişehir 25-29 Eylül, 93-104

Karatepe M, Karatepe B, Cakmak A, Nalbantoglu S (2003) Niğde yöresinde koyun ve keçilerde *Babesia ovis*'in prevalansı. Türkiye Parazitoloj Derg 27:18-20.

Karatepe M, Karatepe B, Duzgun A, Cicek H (2005) Ovine babesiosis in the Amasya Province, Turkey. Indian Vet J 82(3): 248-250.

Kocabeyoglu ZE (2009) Kahramanmaraş yöresinde keçilerde görülen *Babesia* ve *Theileria* türlerinin reverse line blotting (RLB) yöntemiyle araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri

Kose O (2017) Burdur yöresinde ruminantlarda Theileria ve Babesia türlerinin reverse line blot hibridizasyon tekniği ile araştırılması. Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın

Liu AH, Yin H, Guan GQ, Schnittger L, Liu ZJ, Ma ML, Dang ZS, Liu JL, Ren QY, Bai Q, Ahmed JS, Luo JX (2007) At least two genetically distinct large *Babesia* species infective to sheep and goats in China. Vet Parasitol 147:246-251. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.032>

Oter K, Cetinkaya H, Vurusaner C, Toparlak M, Ergunay K (2016) Molecular detection and typing of *Anaplasma* species in small ruminants in Thrace region of Turkey. Kafkas Univ Vet Fak Derg 22:133-138. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2015.14075>

Ozcan C (1961) Ankara ve civarında evcil hayvanlarda görülen Piroplasmose vakaları ve tedavileri üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, Türkiye

Ozer E, Erdogmus SZ, Koroglu E (1993) Malatya ve Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kan parazitleri ve yayılışları. Turk J Vet Am Sci 17(3): 209-215.

Ozkoc Ü (1979) Koyunlarda *B. ovis* enfeksiyonunun Indirekt Floresan Antikor Tekniği ile serolojik teşhisi üzerinde araştırma. Pendik Vet Mikrobiyol Enst Derg 11:70-83.

Ozubek S and Aktas M (2017a) Molecular evidence of a new *Babesia* sp. in goats. Vet Parasitol 233:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.11.016>.

Ozubek S and Aktas M (2017b) Molecular and Parasitological Survey of Ovine Piroplasmosis, Including the First Report of *Theileria annulata* (Apicomplexa: Theileridae) in Sheep and Goats from Turkey. J Med Entomol 54(1):212-220. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw134>.

Ray HN, Raghavachari K (1941) Observations on *Babesia foliata* n. sp. from a sheep. Indian J Vet Sci 11:239-242.

Renneker S, Abdo J, Salih DE, Karagenc T, Bilgic H, Torina A, Oliva AG, Campos J, Kullmann B, Ahmed J, Seitzer U (2013) Can *Anaplasma ovis* in small ruminants be neglected any longer? Transbound Emerg Dis 60(2):105-112. <https://doi.org/10.1111/tbed.12149>

Sarayli H, Inci A, Ica A, Yildirim A, Duzlu O (2006) Yeşilhisar yöresindeki koyun ve keçilerde *Babesia* etkenlerinin Reverse Line Blotting (RLB) yöntemiyle araştırılması. Sağlık Bilimleri Dergisi 15(3):181-188.

Sarwar SM (1935) A hitherto undescribed piroplasm of goats (*Piroplasma taylori*). Indian Jour Vet Sci and Anim Husband 5:171-176.

Sayin F, Dincer S, Karaer Z, Cakmak A, Yukari BA, Eren H, Deger S, Nalbantoglu S (1997) Status of tick-borne diseases in sheep and goats in Turkey. Parasitologia 39:153-156.

Sayin F, Nalbantoglu S, Yukari BA, Cakmak A, Karaer Z (2009) Epidemiological studies on sheep and goat *Theileria* infection. Ankara Üniv Vet Fak Derg 56:127-129.

Schnittger L, Yin H, Gubbels MJ, Beyer D, Niemann S, Jongejan F, Ahmed JS (2003) Phylogeny of sheep and goat *Theileria* and *Babesia* parasites. Parasitol Res 91(5):398-406. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0979-2>

Sevinc F and Dik B (1996) Konya yöresindeki koyunlarda *Babesia ovis*'in ELISA ile teşhisi. Veteriner Bilimleri Dergisi 12(2):73-79.

Sevinc F, Sevinc M, Ekici OD, Yildiz R, Isik N, Aydogdu U (2013) *Babesia ovis* infections: Detailed clinical and laboratory observations in the pre- and post-treatment periods of 97 field cases. Vet Parasitol 191:35-43. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.025>

Sevinc F, Zhou M, Cao S, Ceylan O, Aydın MF, Sevinc M, Xuan X (2018) Haemoparasitic agents associated with ovine babesiosis: A possible negative interaction between *Babesia ovis* and *Theileria ovis*. Vet Parasitol 252:143-147. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.013>

Stuen S (2017) Haemoparasitism of Goats and Sheep. In: Simões J, Gutiérrez C (eds) Sustainable Goat Production in Adverse Environments: Volume I. Springer, Cham, pp 293-315

Tasci S (1989) Van bölgesinde sığır ve koyunlarda görülen kene türleri ile bunların taşıdığı kan parazitleri (Protozoon) arasındaki ilişkiler. Ankara Üniv Vet Fak Derg 36(1):53-63.

Uilenberg G (2006) *Babesia*-a historical overview. Vet Parasitol 138(1-2):3-10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>

Unver A, Sahin M, Erdoğan HM, Celebi O (2005) Koyunlarda *Anaplasma phagocytophilum*'a karşı antikorların Western blot yöntemiyle araştırılması. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 11(2): 99-102.

Yin H, Schnittger L, Luo J, Seitzer U, Ahmed JS (2007) Ovine theileriosis in China: a new look at an old story. Parasitol Res 101(Suppl 2): 191-195. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0689-2>

Zhou M, Cao S, Sevinc F, Sevinc M, Ceylan O, Ekici S, Jirapatharasate C, Moumouni PF, Liu M, Wang G, Iguchi A, Vudriko P, Suzuki H, Xuan X (2017) Molecular detection and genetic characterization of *Babesia*, *Theileria* and *Anaplasma* amongst apparently healthy sheep and goats in the central region of Turkey. Ticks Tick Borne Dis 8(2): 246-252. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.11.006>



Fare, Sıçan ve Tavşanların Viral Hastalıkları

Bahadır Müftüoğlu*, Harun Albayrak

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Ana Bilim Dalı Atakum, Samsun

*Corresponding Author's E-Mail: bahadirmuftuoglu@hotmail.com

Özet

Laboratuvar hayvanlarının kullanımı tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de gün geçtikçe artmaktadır. Özellikle fareler, deney hayvanı popülasyonunda büyük çoğunluğu oluşturmaktadır. Laboratuvar hayvanlarının viral hastalıkları, laboratuvarlar için büyük önem arz etmektedir. Bu derleme deney hayvanlarında görülen viral hastalıklar hakkında literatür eksikliği olması sebebiyle, Tarım Bakanlığı "Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmeliğin Uygulama Talimatı" baz alınarak hazırlanmıştır.

Received 13 May 2019
Received in revised form 16 August 2019
Accepted 20 August 2019

Anahtar kelimeler:

Viral hastalıklar, fare, sıçan, tavşan

Cite this article: Müftüoğlu B, Albayrak H, (2019) Fare Sıçan ve Tavşanların Viral Hastalıkları. Turk Vet J, 1(2):84-89.

Viral Diseases of Mice, Rats and Rabbits

Abstract

The use of laboratory animals is also increasing by time in Turkey as well as all over the world. In particular, mice constitute the vast majority in the experimental animal population, and viral diseases are of great importance for laboratories. This review is based on the Ministry of Agriculture's "Implementation Regulation on the Welfare and Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" because of the lack of literature on viral diseases in experimental animals.

Key words: Viral Diseases, Mice, Rat, Rabbit

Giriş

Laboratuvar araştırmalarında istenilen sonuca daha güvenilir bir yoldan ulaşmak için in vivo yöntemlere olan yönelim giderek artış göstermektedir. İn vivo yöntemler içerisinde ise laboratuvar hayvanları, güvenilir olan seçeneklerden biridir.

Laboratuvar hayvanlarında, deneysel enfeksiyonlarla yapılan çalışmalar, özellikle insan hastalıkları araştırmaları için son derece önemli bir yer tutmaktadır. Deneysel enfeksiyonların dışında laboratuvar hayvanlarında, virus, bakteri, parazit, mantar gibi çeşitli etkenlerin neden olduğu yaygın görülen hastalıklar mevcuttur.

Bu derleme, laboratuvar hayvanlarında (fare, sıçan ve tavşanlarda) görülen, önemli viral hastalıklar hakkında bilgi vermek amacıyla hazırlanmıştır.

Farelerde Görülen Viral Hastalıklar;

Mousepox

Etken, *Poxviridae* familyasında, *Orthopox* genusunda yer alan ve zarflı bir DNA virusu olan *Ectromeliavirustur* (ECTV) (Esteban ve Buller, 2005).

Fareler doğal konakçısıdır. Sıçanlarda sadece deneysel enfeksiyon şekillenmektedir. Hastalığın bulaşmasında başlıca deri abrazyonu ve direkt temas etkilidir. Ancak virus solunum sekresyonları, idrar ve dışkı ile de yayılmaktadır (MacLachlan ve Dubovi, 2016). Hassas türlerde, semptomlar enfeksiyondan sonra 7-11 gün içinde görülmektedir ve virus 3 hafta boyunca gaita ile saçılmaktadır (Criver, 2009).

C57BL/6 ve AKR olarak adlandırılan dirençli fare tiplerinde klinik semptomlar görülmez ve virus saçılımından önce iyileşme görülmektedir (MacLachlan ve Dubovi, 2016). A, CBA, C3H, BALB/c ve DBA/2 gibi duyarlı tiplerin enfeksiyonunda mortalite oranı

%80-90'dır ve ölüm birkaç saat içinde, klinik belirti görülmeden gerçekleşmektedir. Hassas tiplerde, ölüm kısa sürede gerçekleştiği için virus saçılımı sınırlıdır (Criver, 2009; MacLachlan ve Dubovi, 2016). Yarı hassas tipler, generalize enfeksiyon geçirirler. Ani ölüm veya hızlı iyileşme görülmediği için virüsü diğer hayvanlara yayabilirler. Bu tip farelerde klinik semptom olarak dalak, karaciğer, lenfoid dokularda multifokal nekroz, tüm vücutta deri döküntüsü, konjiktivit, ağır enfeksiyonlarda uzuvlar ve kuyrukta nekroz şekillenmektedir (Fox ve ark. 2015; MacLachlan ve Dubovi, 2016).

Enfekte hayvanlarda, histolojik olarak epitel hücrelerinde intrastoplazmik eozinofilik inklüzyon cisimcikleri görülmesi, hastalığın tanısında yardımcı olmaktadır. Ancak serolojik olarak ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ve IFA (İmmun Floresan Testi) testleri daha güvenilir sonuç vermektedir. Deri lezyonlarından alınan örneklerden yapılan PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) testi de doğrulama için kullanılabilir (Fox ve ark. 2015).

Lenfositik Koriomenenjit Virus (LCMV)

Lenfositik Koriomenenjit Virus (LCMV), *Arenaviridae* familyasında *Mammarenavirus* genusunda yer alan zarflı bir RNA virusudur (Criver, 2009).

Virusun ana konakçısı *Mus musculus* türü farelerdir ve zoonozdur. Virus özellikle *Mus musculus* ve *Mus domesticus* türü ev fareleriyle tüm dünyaya yayılmıştır. Vahşi farelerde persiste anne farelerden vertikal bulaşma, yeni persiste hayvanların meydana gelmesine ve virusun devamlılığının sağlanmasına sebep olmaktadır. Doğal yolla enfekte olmuş vahşi farelerde herhangi bir klinik semptom oluşmamaktadır. Persiste hayvanlar ömür boyu taşıyıcı olurlar ve virüsü tükürük, idrar, gaita ve burun sekresyonlarıyla saçarlar (Bonthius, 2012). Persiste hayvanlarda yaşla beraber immuntolere durumu kaybolur ve 'geç hastalık' denilen kilo kaybı ve ölüm şekillenir. Bu farelerde lezyon olarak karakteristik lenfositik koriyomenenjit ve böbreklerde, karaciğerde, akciğerlerde lenfosit infiltrasyonları, immün kompleks glomerulonefrit ve vasculitis görülmektedir (Criver, 2009).

Minute Virus (MVM)

Minute virus, *Parvoviridae* familyasında, zarfsız bir DNA virusudur (Criver, 2009). Virusun doğal konakçıları laboratuvar fareleri ve vahşi farelerdir. Virus

idrara, gaita, oranazal sekresyonlarla ve kontamine biyolojik materyaller ile saçılmaktadır. Virusun çevresel faktörlere karşı dirençli olması, bulaşma ihtimalini de arttırmaktadır. Doğal yolla enfekte olan hayvanlarda hastalık subklinik seyreder. Bazı yenidoğanlar, deneysel enfeksiyonlara karşı duyarlıdır ve klinik olarak ölümcül renal ve/veya intestinal kanamalar görülmektedir. Ancak bu belirtiler doğal enfeksiyonlarda rapor edilmemiştir (Fox ve ark. 2015). MVM persiste enfeksiyon oluşturmamaktadır. İmmün yeterliliği olan bir hayvanda 4 haftadan daha kısa bir sürede organizmadan elemine edilmektedir (Criver, 2009). Virusta vertikal bulaşma rapor edilmemiştir (Fox ve ark. 2015).

Adenovirus Enfeksiyonu (MAV)

Adenovirus, *Adenoviridae* familyasından zarfsız bir DNA virusudur. Laboratuvar farelerinde ve vahşi farelerde (*Mus musculus*) Mastadenovirus cinsinde iki tip virus görülmektedir: Murine Mastadenovirus A (MAV-1 ya da FL) ve Murine Mastadenovirus B (MAV-2 ya da K87). İki tip de fare böbrek hücre kültüründe üreyebilmektedir ancak antijenik olarak farklıdır. (Fox ve ark. 2015). Önceki çalışmalar, immün yeterliliği olan farelerin her yaşta MAV-1 ile enfekte olabileceğini göstermiştir. Ancak morbidite ve mortalite özellikle yeni doğan ve emen hayvanlarda görülmüştür. MAV-1'e karşı direnç, fareler 14-27 günlük olana kadar hızlı bir şekilde artış göstermektedir (Guida ve ark. 1995).

Başta MAV-1 olmak üzere virusun fare kolonilerindeki prevalansı düşüktür. Ancak yeni doğanların MAV-1 ile deneysel enfeksiyonlarında büyümede durma, letarji ve 10 gün içinde ölüm gibi ciddi klinik tablolar görülmektedir. Yetişkin immün yeterliliği olan farelerin deneysel enfeksiyonlarında fareler persiste enfekte kalabilmekte ve uzun süre virüsü idrarıyla saçabilmektedir. Yetişkin farelerin MAV-2 ile deneysel enfeksiyonunda, virus yine klinik belirti göstermeden persiste kalarak 3 hafta kadar gaitada bulunabilir (Fox ve ark. 2015). Yetişkin C57BL/6 ve SJL/J tip fareler MAV-1'e karşı duyarlı olup nörolojik semptomlar gösterirken, BLAB/c tip fareler yüksek doz deneysel enfeksiyon dışında herhangi bir semptom göstermezler (DORA, 2013). Virusa karşı tek yönlü bir çapraz koruma oluşmaktadır. MAV-1 antikoru MAV-2'ye karşı da korurken MAV-2 antikoru MAV-1'e karşı korumamaktadır. Bu yüzden serolojik testlerde kombine antijen kullanılmalıdır. (DORA, 2013).

Fare Sitomegalovirus (MCMV)

Fare sitomegalovirusu (MCMV), *Herpesviridae* ailesinde yer alan zarflı bir DNA virusudur (Krpmotic ve ark. 2003). Virusun doğal yolla enfeksiyonu nadir olarak görülmektedir. Virus horizontal olarak, enfekte hayvanın tükürük, gözyaşı ve idrarıyla temas yolu ile bulaşır. Vertikal bulaşma doğal enfeksiyonlarda görülmezken deneysel olarak gerçekleşebilmektedir. İmmun yeterliliği olan hayvanlarda hastalık asemptomatiktir ve persiste enfeksiyon oluşturur. Virus epiteliyal ve endoteliyal hücreler, miyositler, kahverengi yağ hücreleri, fibrositler, makrofajlar ve kemik iliği hücreleri gibi çeşitli birçok hücrede replike olur ve latent olarak kalır (Krpmotic ve ark. 2003). Virusun enfekte ettiği dokularda, başta servikal tükürük bezleri olmak üzere, karakteristik megalositik değişiklikler; eozinofilik intranükleer ve/veya intrastoplazmik inklüzyon cisimleri görülebilmektedir (Fox ve ark. 2015). İmmunsupresif hayvanlarda hastalık, organlarda yüksek virus replikasyonu ve nekroza neden olmasından dolayı yüksek mortaliteye sahiptir (Krpmotic ve ark. 2003).

Fare Hepatitisvirus (MHV)

MHV'nin etkeni *Coronaviridae* ailesi üyesi bir RNA virusu olan *Murine Coronavirustur*. Hastalık oldukça bulaşıcıdır ve başlıca aerosol, direkt temas, fomitler ve deneysel olarak da transplant tumorlerle ve transplental pasajlarla bulaşmaktadır (Baker, 1998). MHV, organ tropizmlerine göre iki biyotip barındırmaktadır; politropik ve enterotropik suş (Compton ve ark. 2004). Politropik MHV suşu, önce burun mukozasına yerleşir, akciğerlere iner ve kan yoluyla çoklu organ enfeksiyonu ve nöronlar boyunca ilerleyerek de MSS'yi enfekte etmektedir. Enterotropik MHV suşu, burun mukozası veya barsaklara yerleşebilir ancak başlıca barsaklar, abdominal lenf nodülleri, karaciğer ve bazı durumlarda MSS'yi enfekte eder (Baker, 1998). İmmun yeterliliği olan farelerde hastalık asemptomatiktir. Süt emen yavruların enterotropik MHV suşu ile enfeksiyonu, iştahsızlık, ishal, dehidrasyon ve genellikle ölümle sonuçlanır. Üretilen kolonilerde, yenidoğanlar arasındaki enterotropik suşun enfeksiyonu %100 ölümle sonuçlanmaktadır (Fox ve ark. 2015). Enterotropik suşla enfeksiyon lezyonlar barsak epiteliyle sınırlı kalmaktadır. Barsak epitel hücrelerinde lizis, ince barsağın sonundaki vililerde atrofi ve sinsityal hücreler görülmektedir. Politropik suşlar birçok organda replike olma yeteneğine sahip

olduğu için, immün yetersiz hayvanın politropik suşla enfeksiyonu da ciddi lezyonlara yol açmaktadır. Karaciğer, dalak, lenf nodülleri ve kemik iliğinde sinsityal hücreler ve nekroz görülmektedir. Eğer enfekte hayvan yeni doğan ise benzer lezyonlar beyinde de görülmektedir (Criver, 2013). İmmün yeterli fareler 30 gün içinde hastalığı elemine edebilirler. Yavrular da bağışık annelerden emilen süt ile korunabilmektedirler (Fox ve ark. 2015).

Fare Rotavirusu (EDIM)

EDIM virusu, *Reoviridae* familyasından Rotavirus A grubundan zarfsız bir RNA virusudur (DORA, 2013). Hastalık, karakterinden dolayı yeni doğan farelerin epizootik diyaresi olarak bilinir (Baker, 1998). EDIM virusu, öldürücü değildir ancak oldukça bulaşıcıdır ve oral fekal, direkt temas ve hava ile bulaşır (Baker, 1998). Klinik olarak sulu, sarı renkli dışkı, letarji ve şişkin abdomen, doğumdan 2 haftalığa kadar olan farelerde görülür (Baker, 1998). 2 haftalıktan büyük farelerde klinik bulgulara rastlanmamıştır. Virus barsak villus epitelinde vakuollere ve piknotik hücre oluşumuna yol açmaktadır. Bu da maladsorbsiyon ve osmotik diyareye sebep olmaktadır (Fox ve ark. 2015). Diyare tablosu yaklaşık 9 gün sonra bitmektedir fakat virus saçılımı 2 hafta kadar devam etmektedir (Barthold, 1985). EDIM virusu, hızlı bir iyileşme tablosu gösterdiği için, koloni üretiminde 4-6 haftalık bir bekleyiş, hastalıktan kurtulmada etkili olacaktır. Düzenli serolojik kontroller ve bilinen hayvanların alınması hastalıktan korunmada yeterlidir (Fox ve ark. 2015).

Reovirus Tip 3 (MRV-3)

Reovirus tip 3, *Reoviridae* familyasından *Orthoreovirus* genusunda zarfsız bir RNA virusudur (Baker, 1998). MRV-3, Reovirus serotipleri arasında laboratuvar rodentlerinde en sık görülen serotiptir. Bulaşma fekal oral ve direkt temasla olur. Hastalığın yetişkin farelerde doğal enfeksiyonu asemptomatiktir. Fare türüne bağlı bir duyarlılık bildirilmemiştir. 2 haftalık yaşa kadar olan ve hastalığı daha önce geçirmemiş olan fare kolonilerinde klinik semptomlar gözlenir. Virusun yenidoğanlarda oral inokulasyonundan sonra virus kan, lenf ve sinir sistemi yoluyla tüm vücuda yayılır. 10-12 günlük bir inkübasyondan sonra semptomlar görülmeye başlar (Percy ve Barthold, 2013). Klinik olarak, sarılık, zayıflama, abdominal gerginlik, yağlı dışkılamadan dolayı yağlı ve mat tüy görüntüsü ve ölümden önce

tremor, inkoordinasyon ve paraliz gözlenmektedir. Sarılık görüntüsü ayaklar, kuyruk ve burundan görülebilir İyileşen hayvanlarda geçici dorsal alopesi görülmektedir (Fox ve ark. 2015).

Sendai Virus (SV)

Sendai virus, *Paramixoviridae* familyası, *Respirovirus* genusu ve parainfluenza tip 1 grubunda bulunan bir RNA virusudur (Baker, 1998). SV çok bulaşıcıdır ve solunum sekresyonlarıyla direkt temas ve aerosol yolla yayılmaktadır (Fox ve ark. 2015). DBA/2 fare suşu, yeni doğanlar ve yaşlı fareler duyarlıyken, C57Bl/6 fare suşu, immun yeterli yetişkin fareler dirençlidir ve hastalığı subklinik olarak geçirirler (Barthold ve ark. 2016). Etkilenen farelerde kaba kıl örtüsü, gözlerde kabuklanma, diş gıcırdatma, dispne, kilo kaybı, gençlerde ölüm, hamilelerde gebeliğin uzaması ve fetal rezorpsiyon görülebilmektedir (Baker, 1998; Fox ve ark. 2015). SV, alveolar tip 2 hücreleri başta olmak üzere, respiratorik epitel hücrelerinde üremektedir. Histopatolojik olarak karakteristik bronkointerstitiyel pnömoni gelişmektedir ve bu, multifokal adenomatöz değişikliklere, skuamöz metaplazilere, ciddi vakalarda da organize alveolitislere neden olabilmektedir (Fox ve ark. 2015). SV enfeksiyonu immun yeterli farelerde asemptomatiktir. Süt emen fareler de enfeksiyonu geçirmiş annelerden maternal antikorlarla korunurlar (MachLachlan ve Dubovi, 2016).

Ensefalomyelitisi virus (TMEV)

TMEV, *Picornaviridae* familyasında *Cardiovirus* genusunda yer alan zarfsız bir RNA virusudur (Masseli ve ark. 2005). Virus oral fekal yolla bulaşır ve semptom göstermeden barsaklarda çoğalır (Masseli ve ark. 2005). Doğal enfeksiyonların çoğu asemptomatiktir. Fareler deneysel enfeksiyonlarla çoklu skleroz (MS) için model olarak kullanılmaktadır. TMEV merkezi sinir sisteminde hastalık oluşturabilmesine göre iki alt gruba, GDVII ve TO, ayrılmıştır. GDVII, fareler için oldukça nörovirulenttir ve 1-2 hafta içinde ölüme neden olur. TO, akut fazda enfeksiyondan 1 hafta sonra polioensefalomyelitise, kronik fazda enfeksiyondan 1 ay sonra demiyelinizasyona neden olmaktadır (Tsunoda ve Fujinami, 2010). Klinik semptom olarak karakteristik ön ve ayaklarda paraliz görülür. Bazı fareler iyileşebilmektedir ancak ilerleyen zamanlarda genel olarak gıda ve su alımında problem yaşanmasından dolayı ölüm gerçekleşmektedir. Paralitik sendromu atlatan hayvanlarda da kronik demiyelinasyon fazı

yürüşte bozuklukla kendini göstermektedir (Fox ve ark. 2015).

Sıçanlarda Görülen Viral Hastalıklar

Kilham Sıçan Virus (KRV)

KRV, *Parvoviridae* ailesi, zarfsız bir DNA virusudur (National Research Council, 1991). Bulaşma, enfekte dışkı, idrar, nazal akıntılar, süt ve kontamine fomitlerle gerçekleşir (Baker, 1998). Enfekte yeni doğanlarda virusun 14 haftaya kadar persiste kalabildiği bildirilmiştir. Vertikal bulaşma da yapılan deneylerle gösterilmiştir (Novotny ve Hetrick, 1970). Doğal enfeksiyonlarda klinik semptomlar nadir görülür ancak 13 günlük hamile hayvanlarda klinik semptomlar rapor edilmiştir. Bu semptomlar, yavrularda fetal rezorpsiyon alanları, ataksi, serebellar hipoplazi ve birçok yavruya yürüyüş bozukluğu olarak bildirilmiştir. KRV'nin, aktif olarak proliferen olan hücrelerin bulunduğu dokulara tropizmi vardır ve bu yüzden klinik semptomlar ve patolojik lezyonlar daha çok fetüslarda ve yeni doğanlarda görülür (National Research Council, 1991). Lezyonlar MSS, gastrointestinal sistem ve reproduktif sistem organları da olmak üzere birçok organda görülür. Özellikle karaciğerde fokal nekrozlar, hemoroji ve hiperplazi görülmektedir (Baker, 1998). Deneysel enfeksiyonlarda sıçanlarda yüksek doz virus inokulasyonlarında, serebellar hipoplazi, hemarajik ensefalopati ve hepatitis görülmektedir. Ayrıca Suriye hamsterlerinde de serebellar hipoplazi, mongolizm ve periodontal hastalıklar görülmektedir (National Research Council, 1991).

Toolan H-1 Virus

Toolan H-1 virusu, *Parvoviridae* familyasından zarfsız bir DNA virusudur. Virusun doğal konakçıları vahşi ve laboratuvar sıçanlarıdır. Bulaşma idrar, dışkı, nasal sekresyonlar ve süt ile gerçekleşir. Çalışmalar daha çok KRV üstünde yapıldığı için H-1 virusu hakkında bilinenler sınırlıdır. H-1 virusu da KRV gibi çoğalmaya meyilli doku hücrelerinde replike olmaktadır. Doğal enfeksiyonda herhangi bir klinik semptom rapor edilmemiştir. Ancak sıçan ve hamsterlerin fetal ve yeni doğanların deneysel enfeksiyonlarında, cerebellar hipoplazi, mongolizm, kemik ve diş problemleri, çoklu organ malformasyonları rapor edilmiştir (National Research Council, 1991).

Sıçan Coronavirus (SDAV)

Sialodacryoadenitis virus (SDAV), *Coronaviridae* familyası, *Betacoronavirus* genusundan zarflı bir RNA virusudur (Baker, 1998). SDAV enfeksiyonu ölümcül değildir ancak laboratuvar sıçanları arasında yüksek derecede bulaşıcıdır. Enfekte hayvanlar virüsü bir haftaya kadar saçarlar. Bulaşma direkt temas, aerosol ve fomitler aracılığıyla gerçekleşir. Hastalık bütün yaş grubundaki sıçanları enfekte edebilir ancak süt emen ve genç hayvanlar daha duyarlıdır (Henry J ve ark. 2013). Virüsün tükürük bezleri, lakrimal bezler ve respiratorik mukozaya tropizmi vardır. Klinik semptomlar geçicidir. Servikal ödem, hapşırma, fotofobi, konjunktivitis, nazal ve okuler akıntı, korneada ülser ve keratitisi görülen klinik semptomlardır (Henry ve ark, 2013). Semptomlar bütün enfekte hayvanlarda görülmeyebilir, hafif veya ağır seydebilir. Hastalığı geçirmiş hayvanda semptomlar gözlenmez ancak virus saçılmaya devam eder (Henry ve ark. 2013).

Tavşanlarda Görülen Viral Hastalıklar

Tavşanların Hemorojik Sendrom Virüsü (RHDV)

RHDV, *Caliciviridae* familyasından, *Lagovirus* genusundan zarfsız bir RNA virusudur (Abrantes ve ark. 2012). RHDV, Avrupa vahşi tavşanlarında (*Oryctolagus cuniculus*) ve onun evcilleştirilmiş soyu olan *Lepus europaeus* tavşanlarında ciddi enfeksiyon oluşturmaktadır (Mitro ve Krauss, 1993). Bulaşma direkt temas, fomitler ve enfekte hayvanın sekret ve ekskretleriyle gerçekleşir. Klinik olarak 3 safha vardır. Akut formda tavşanlar herhangi bir semptom göstermeden enfeksiyondan 12-36 saat sonra ölürlür. Subakut formda hafif semptomlar görülür ve çoğu hayvan hastalığı atlatır. Kronik formun görülme yüzdesi düşüktür ve tavşanlarda ağır bir sarılık, anoreksi ve letarji tablosu görülür. Bu hayvanlar genellikle enfeksiyondan 1-2 hafta sonra ölürlür. Kurtulan hayvanlarda yüksek bir antikor titresi oluşur (Abrantes ve ark. 2012). Virüsün ana hedefi başlıca karaciğer, dalak ve akciğerlerdir. Histopatolojik olarak karaciğerde akut hepatik nekroz, splenomegali, bir çok organda ve özellikle akciğer, kalp, böreklerde yaygın intravasküler koagülasyona bağlı hemoroji ve konjesyon görülür (Baker, 1998; (Abrantes ve ark. 2012). Kan değerlerinde de lenfopeni, trombositopeni ve pıhtılaşma süresinde uzama gibi değişiklikler gerçekleşir (Baker, 1998).

Myxomatosis

Myxoma virus, *Poxviridae* familyasından, *Leporipox* genusunda bir DNA virusudur. Myxoma virusun doğal izolatları, Avrupa tavşanları için ölümcüldür. Saçılım sivrisinek, pire gibi kan emici artropod vektörlerle olur. Virus karakteristik olarak yüz, kafada şişme ve mukoid kutanöz tümörlere neden olur (Kerr ve Best, 1998). Klinik semptomlar virus suşuna ve konakçıya göre değişiklik göstermektedir. California gibi virulent suşlar tavşanda ani ölüme sebep olmaktadır. Klinik olarak göz kapaklarında, nasal, genital ve oral deliklerin etrafında konjunktivitis, ödem ve inflamasyon şekillenmektedir. Generalize enfeksiyondan dolayı patolojik değişiklikler birçok organda görülebilmektedir. Akciğer, karaciğer, dalak, böbrek, lenf nodülleri ve testiste dejenerasyon ve nekrozla takip eden hemorajiler görülür (Baker, 1998).

Laboratuvar tavşanlarına, tavşan fibroma virus, attenüe myxoma virus ve attenüe campelpox virus suşları aşılarıyla koruma sağlanabilir (MacLachlan ve Dubovi, 2016).

Tavşan Rotavirus

Rotavirus, *Reoviridae* familyası üyesi bir RNA virusudur. Enfeksiyon, vahşi ve laboratuvar tavşanlarında sıklıkla görülmektedir (Baker, 1998). Virus oral fekal yolla bulaşmaktadır oldukça bulaşıcıdır. Enfekte hayvanlar ağır müköz veya sulu ishal, anoreksi ve dehidrasyon gözlenir. Hastalık 8-12 günlük tavşanlarda %100 e kadar mortalite göstermektedir. Klinik belirti gösteren tavşanlar 1-2 gün sonra ölüm görülür. Enfeksiyonlar genellikle diyareye sebep olan bakterilerle beraber gerçekleşmektedir (Manning ve ark. 2014). Sadece virusa bağlı enfeksiyonların daha hafif geçirildiği gözlemlenmiştir. Patolojik olarak kolonda konjesyon, gerginlik ve hemoroji, fluid dolu sekum görülmektedir (Baker, 1998).

Sonuç

Bilimsel çalışmalarda deney hayvanları önemli bir yer tutmaktadır. Çalışmaların güvenilirliğinde de özellikle deney hayvanlarının bakteri, mantar ve viral hastalıklar açısından ari olması aranmaktadır. Bu derlemede laboratuvar hayvanlarında görülen önemli viral hastalıklara dikkat çekilmesi amaçlanarak güncel bilgiler sunulmuştur.

Kaynaklar

- Abantes** J, Loo W, Pendu J, Esteves P (2012) Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res.* 43(1): 12. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-12>.
- Baker** D (1998) Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clin Microbiol Rev.* 11(2): 231-266. Doi: 10.1128/CMR.11.2.231
- Barthold** S, Griffey S, Percy D (2013) Pathology of laboratory rodents and rabbits. 4th edn. John Wiley & Sons, Iowa. 33-35.
- Barthold** S, Jones T, Mohr U, Hunt R (1985) Murine rotavirus infection, intestine, mouse. Digestive system. 1. Edn, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Germany. 384-389.
- Bonthius** D (2012) Lymphocytic choriomeningitis virus: An under-recognized cause of neurologic disease in the fetus, child, and adult. *Semin Pediatr Neurol.* 19(3): 89-95. Doi: 10.1016/j.spen.2012.02.002
- Anonim (2009) <http://www.criver.com>. Erişim Tarihi 12 Mart 2019.
- Compton** S, Ball-Goodrich L, Paturzo F, Macy J (2004) Transmission of enterotropic mouse hepatitis virus from immunocompetent and immunodeficient mice. *Comp Med.* 54(1): 29-35.
- Anonim (2013) <http://dora.missouri.edu>. Accessed 12 March 2019.
- Esteban** D, Buller L (2005) Ectromelia virus: the causative agent of mousepox. *Journal of General Virology* 86: 2645–2659. Doi: 10.1099/vir.0.81090-0.
- Fox** J, Anderson L, Otto G, Pritchett-Corning K, Whary M (2015) *Laboratory Animal Medicine.* 3. edn Elsevier Inc., Oxford, England. 43-137.
- Genç** B, Aksoy A (2017) Laboratuvar Hayvanları Model Seçiminde Soyların Önemi. *Türkiye Klinikleri J Lab Anim* 1(1): 20-7. Doi: 10.5336/jlabanim.2016-50700.
- Guida** J, Fejer G, Pirofski L, Pirofski A, Brosnan C, Horwitz M (1995) Mouse adenovirus type 1 causes a fatal hemorrhagic encephalomyelitis in adult C57BL/6 but not BALB/c mice. *J Virol.* 69(12): 7674-7681.
- Janus** L, Mahler M, Köhl W, Smoczek A, Hedrich H, Bleich A (2008) minute virus of mice: antibody response, viral shedding, and persistence of viral DNA in multiple strains of mice. *Comp. Med.* 58(4): 360-368.
- Kerr** P.J, Best S.M (1998) Myxoma virus in rabbits. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 17(1): 256-268.
- Krmpotic** A, Bubic I, Polic B, Lucin P, Jonjic S (2003) Pathogenesis of Murine Cytomegalovirus Infection. *D.M. Ojcius. Microbes Infect.* 5(13): 1263-1277.
- Little** L, Shaddock J (1982) Pathogenesis of rotavirus infection in mice. *Infect Immun.* 38(2): 755-763.
- MacLachlan** N, Dubovi J (2016) *Fenner's Veterinary Virology.* 5. Baskı, Elsevier Inc., Hampshire, İngiltere.
- Manning** P, Ringler D, Newcomer C (2014) *The biology of laboratory rabbit.* 2. Baskı, Academic Press., California, ABD.
- Masseli** R, Soares M, Rovilson G, Aparecida G, Aparacida A, Viccari G, Viccari M (2005) Theiler's murine encephalomyelitis virus in nonbarrier rat colonies. *Comp Med.* 55(5): 459-464.
- Mitro** S, Krauss H (1993) Rabbit hemorrhagic disease: A review with special reference to its epizootiology. *Eur J Epidemiol.* 9(1): 70-78.
- National Research Council;** Institute for Laboratory Animal Research; Commission on Life Sciences; Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats. *Infectious Diseases of Mice and Rats* (1991) Washington, National Academies Press. 422-428.
- Novotny** J, Hetrick F (1970) Pathogenesis and transmission of Kilham Rat Virus infection in rats. *Infect Immun.* 2(3): 298-303.
- Parker** J, Whiteman M, Richter C (1978) Susceptibility of inbred and outbred mouse strains to sendai virus and prevalence of infection in laboratory rodents. *Infect Immun.* 19(1): 123-130.
- Percy** D, Barthold S (2013) Pathology of laboratory rodents and rabbits. 3. Baskı. John Wiley & Sons, Iowa, ABD.
- Tsunoda** I, Fujinami R (2010) Neuropathogenesis of theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 5(3): 355-369.



Virüslerin Reverz Genetiği

Hasan Abaylı

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

*Corresponding Author's E-Mail: habayli@firat.edu.tr

Özet

Reverz genetik, genom üzerindeki dizilerin fonksiyonlarını belirlemeye yönelik girişimlere imkan tanıyan güçlü sistemlerden oluşmaktadır. Virüslerin kolay manipüle edilebilir yapısı ve hızlı fenotipik karakter sergileme özelliği virüs reverz genetiği alanındaki gelişmeleri de beraberinde getirmiştir. Virüs reverz genetiği, özellikle dinamik yapısıyla mutasyon oluşturmaya müsait, yüksek patojenik RNA virüsleri hakkındaki bilinmezliklerin ortaya çıkarılmasında önemli görevler üstlenmektedir. Bu görevlerin başında viral patogenez ve virülens faktörlerin belirlenmesi sonrasında ise yüksek immunojenik, non-patojenik -iyi virüs- üretme girişimleri gelmektedir. Bu derlemede reverz genetik sistemler sistemleri ve mevcut gelişmeler hakkında bilgi verilmektedir.

Received 2 July 2018
Received in revised form 2 August 2018
Accepted 4 August 2018

Anahtar kelimeler:

Enfeksiyöz klon, kurtarma sistemleri, reverz genetik, virüs

Cite this article: Abaylı H (2019) Virüslerin Reverz Genetiği. Turk Vet J, 1(2):90-100.

Reverse Genetics of Viruses

Abstract

Reverse genetics are powerful systems that allow for attempts to determine the functions of sequences on genetic material. Easier manipulation of viruses and rapid phenotypic characterization have led to advances in the field of virus reverse genetics. Virus reverse genetics play an important role in the detection of obscure high pathogenic RNA viruses, which are suitable for mutation with its dynamic structure. The most important of these roles are the high immunogenic, non-pathogenic-good virus-producing interventions after viral pathogenesis and virulence factors are determined. In this review, information about reverse genetic systems and current developments is presented.

Key words: Infectious clone, rescue systems, reverse genetics, virus

Giriş

Gen ve fonksiyonu arasındaki ilişkiyi tanımlamaya yönelik geleneksel yaklaşımlar doğal veya yapay mutantlardan biyolojik bozukluğu gösterenlerin ayırt edilerek gen düzeyinde (haritalama gibi yöntemler ile) incelenmesi üzerine kurulmuştur. *Klasik genetik* veya *forward genetik* olarak adlandırılan bu yaklaşımda başlangıç materyali mutant fenotiptir dolayısıyla elde edilecek bilginin akış yönü fenotipten genotipe doğru olmaktadır. Klasik genetikte olduğu gibi rastgele ortaya çıkmış bir mutant üzerinde çalışarak o geni veya şifrelediği proteini bulmak yerine, çalışmaya ilgilenilen fakat işlevi bilinmeyen, klonlanmış bir genle başlanabilmekte ve bu geni bozma girişiminde bulunarak genin işlevi analiz edilmeye çalışılmaktadır. Geleneksel araştırma yönünün tersine yapılan (genden > fenotipe) ve başlangıç materyali gen olan bu yaklaşıma *reverz genetik* (ters genetik) adı verilmektedir (Sortle ve

ark., 1981, Temizkan G, 2013, Griffiths ve ark., 2004, Jason, 2009).

Viroloji alanında reverz genetik, ilgili tüm viral dizilerin cDNA'lar şeklinde klonlanması, modifikasyonu ve kültür ortamında ya da organizma üzerinde fonksiyonlarının incelenmesi manasında kullanılmaktadır. Değiştirilen dizilerle birlikte sil baştan üretilen enfeksiyöz virüsün kültür ortamından izole edilmesi veya kurtarılmasına ithafen bazı araştırmacılar reverz genetik terimi yerine, *kurtarma sistemi* (rescue system-recovery system) terimini kullanmayı tercih etmektedir (Neumann ve ark., 2002).

Virüslerin nispeten küçük genoma sahip olmaları ve hücre içerisinde kısa sürede çoğalabilmelerinden dolayı ilgili gen fenotipi hızla belirlenebilmektedir. Reverz genetiğin gelişmesi özellikle viroloji alanında devrim yaratmıştır. Virüs atenuasyonu, konak özgüllüğünün

değiştirilmesi, replikasyon defektli virüslerin üretimi, yeni aşı stratejilerinin geliştirilmesi, viral gen ve dizilerin fonksiyonlarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Sola ve ark., 2003).

DNA genomuna sahip virüsler, tam uzunlukta DNA klonları oluşturularak homolog rekombinasyon teknolojileri ile genetik olarak değiştirilenlerin ilkinin teşkil etmektedir. Modifiye edilmiş DNA genomundan üretilen ilk rekombinant soy SV40 virüsüdür (Goff & Berg, 1976). Birçok DNA virüsü gibi SV40'nin genomu da ökaryotik promotörler içerdiğinden tek başına infeksiyözdür. Konak hücrenin replikasyon ve transkripsiyon mekanizmasını kullanarak çekirdekte transkribe ve replike olmaktadır (Barbanti-Brodano ve ark., 1970, Buchman ve ark., 1981). DNA virüslerin genomları klonlama veya direk olarak manipülasyon için oldukça büyüktür, bu virüsler için homolog rekombinasyon yaklaşımı daha uygundur. Herpes, pox ve adenovirüslerde uygulanan bu yaklaşımda viral dizilerle çevrili rekombinant DNA, vahşi tip virüse ait tam viral DNA ile birlikte hücreye aktarılmaktadır (transfeksiyon). Vahşi tip ve rekombinant virüs karışımında rekombinant virüs ortamdan kurtarılmaktadır (Jones & Shenk, 1978, Mackett ve ark., 1982, Post & Roizman, 1981).

RNA virüs reverz genetiğin geçmişi 1978'lere dayanmaktadır. Tam uzunluktaki Qbeta bakteriyofaj genomunun cDNA biçiminde plazmide aktararak E.coli'ye transforme edilmesi sonrasında plak oluşumu gözlenmiştir (Taniguchi ve ark., 1978). Racaniello ve Baltimore (1981), viral RNA genomunu cDNA yapısında plazmide klonlayarak hücre kültür ortamında poliovirüsü üretmeyi başarmıştır. Sonraki yıllarda T3 veya T7 RNA polimeraz sistemi kullanılarak birçok (+) ssRNA virüse (alfavirüs, picornavirüs, flavivirüs) ait sentetik RNA transkriptleri sentezlenmiş ve bu transkriptlerin hücreye aktarımı ile virüs üretimi gerçekleştirilmiştir (Boyer & Haenni, 1994).

Negatif anlamlı RNA virüs genomları hücre transkripsiyon ve translasyon mekanizması tarafından tanınmamaktadır (Friedman ve ark., 1981). Dolayısıyla bu virüsler ihtiyaç duydukları yapıları virion içerisinde RNP kompleks (RNA, NP ve replikasyon proteinleri) biçiminde bulundurarak pozitif anlamlı virüslerden farklı bir strateji geliştirmişlerdir. Bu kompleks negatif anlamlı virüslerin minimal replikasyon ünitesini teşkil etmektedir (Conzelman, 1998, Bridgen & Eliot, 1996). Bu biyolojik gereksinimlerden dolayı reverz genetik sistemleri (-) RNA virüslerine daha geç uyarlanabilmiştir. Klonlanmış cDNA'dan tümüyle

kurtarılan ilk segmentsiz (-) RNA virüsü kuduz virüsü (1994) olurken ilk segmentli (-) RNA virüsü ise Bunyamwera virüs (3 segmentli) (1996) olmuştur. Ardından birnavirüs ve influenza gibi birçok virüse benzer sistemler uygulanmış ve enfeksiyöz virüs üretimi gerçekleştirilmiştir (Mundt & Vakharia, 1996, Fodor ve ark., 1999, Neuman ve ark., 1999, Schnell ve ark., 1994, Collins ve ark., 1995).

Rekombinant Enfeksiyöz Virüs Üretimi

T7 Polimeraz sistemi/Stoplazmada Transkripsiyon: Pozitif anlamlı RNA virüsleri konak hücrenin translasyon mekanizması tarafından tanınması dolayısıyla kendi proteinlerini hücrede sentezleterek replike olabilmektedir (Neumann ve ark., 2002). Viral mRNA'ların hücreye transfeksiyonu bu virüslerin kurtarılması için yeterli olsa da viral genomun genetik olarak manipüle edilebilmesi için vRNA'nın cDNA klonuna dönüştürülmesi gerekmektedir. cDNA'dan vRNA'ları ve proteinleri üretmek için viral dizilerin ya hücre içerisinde mevcut olması ya da bir promotör kontrolünde plazmide klonlanarak hücreye transfeksiyonu gerekmektedir (Bayou, 2017). RNA virüs reverz genetik çalışmalarında en sık kullanılan transkripsiyon sistemi viral RNA'nın sitoplazmik transkripsiyonuna izin veren T7 RNA polimeraz aracılı sistemlerdir. Hücre ortamında T7 RNA polimeraz, transfekte edilen plazmidten veya polimeraz proteini eksprese eden yardımcı virüslerden temin edilebilmektedir (Racaniello & Baltimore, 1981, Boyer & Haenni, 1994, Palese ve ark., 1996). Vaccinia virüse dayalı yardımcı virüs sistemi (vTF7-3) çok etkili transkripsiyon verimliliğine sahiptir. Ancak hücrelerde sitopatik etkiler oluşturarak kurtarma verimliliğini düşürebilmektedir. Ayrıca enfekte hücrelere cytosine beta arabinoside (Ara-C) ve/veya rifampicin antiviral bileşenlerin ilavesiyle vaccinia virüs replikasyonu kontrol altında tutulmalıdır (Elroy-Stein & Moss, 1989). T7 RNA polimeraz eksprese eden kalıcı hücre hatlarının üretimi ile bu sorun ortadan kalkmıştır (Radecke ve ark., 1995, Buchholz ve ark., 1999). SARS coronavirüs gibi büyük genoma sahip RNA virüslerde rekombinant virüs üretimi için kullanılan ek bir platform bakteriyel yapay kromozom (BAC)'dur. Bu yapılar, büyük DNA/RNA fragmentlerin eklenmesine izin veren T7 promotörlü, E. Coli'den türetilen tek kopyalı F plazmidleridir. BAC yapıları DNA virüslerin kurtarılmasında uzun süredir kullanılmaktadır. Bu yapıların genetik dayanıklılığı RNA virüslerde de kullanımına yol açmıştır (Almazan ve ark., 2013, DeDiego ve ark., 2007, Balint ve ark., 2012). Bütün pozitif anlamlı RNA virüsleri tek genom

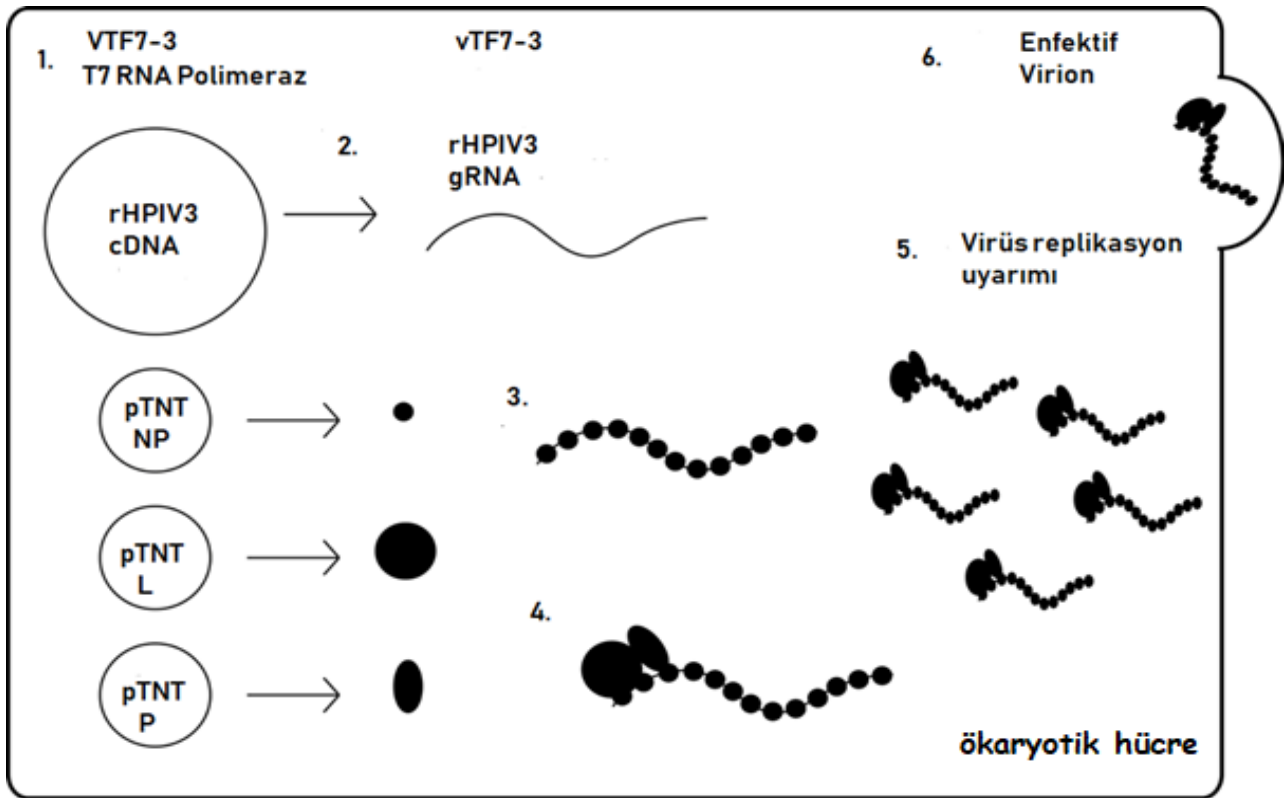
segmentinden oluşur ve viral RNA hem genom replikasyonuna şablon görevi görür hem de mRNA olarak görev yapmaktadır. Bu sebeple uygun hücrel veya viral promotör kontrolü altındaki viral cDNA'yı içeren tek bir plazmid pozitif anlamlı RNA virüsleri reverz genetiği için yeterlidir (Pushko ve ark., 2016, Stobart & Moore, 2014).

Negatif anlamlı viral RNA genomuna ait genetik kodları taşıyan cDNA klonlarından virüsün kurtarılması tek başına mümkün değildir. Bu virüslere ait reverz genetik sistemleri genellikle viral RNA polimerazın tanıyabileceği yardımcı yapıların ve genomik replikasyonu başlatmak için diğer esansiyel proteinlerin kullanımını gerektirmektedir (Bucholz ve ark., 1993, Friedman ve ark., 1981, Storey ve ark., 1984). İlk kurtarma sistemleri, T7 polimeraz ile yapay üretilen vRNA'nın pürifiye RNP kompleks proteinleri ile in vitro bir araya getirilerek kompleksin oluşturulması ve vahşi tip virüsle enfekte hücelere transfeksiyonuyla gerçekleştirmişlerdir. Buna rağmen başarılı sonuçlar alınarak yapay RNP kompleksini içeren rekombinant virüs üretimi oluşturabilmişlerdir (Luytjes ve ark., 1989). Pattnaik ve Wertz (1991) VSV viral proteinlerin tamamını ekspresyon plazmidlerinden sağladığı bir minireplikon sistemini kurmayı başarmıştır. Bunun için 4 veya 5 plazmidin kotransfeksiyonuna gereksinim duyulmaktadır. Bu plazmidlerden biri (-)vRNA'yı kodlayan antigenomik (+)cDNA'nın 5' ucuna T7 polimeraz promotör dizisi, 3' ucuna da ribozim dizisinin eklenmesiyle oluşturulmuştur. Görevli diğer plazmidler viral replikasyon proteinlerin ekspresyonu için gereklidir. Bu plazmidlerin T7 polimeraz üreten hücelere kotransfeksiyonu ribonükleoprotein kompleks oluşumu ve sonrasında enfeksiyöz virüsün kurtarılması ile sonuçlanmaktadır. Farklı yaklaşımlarla edinilen deneyimler RNA bağımlı RNA polimeraz (L), nükleoprotein (N) ve fosfoprotein (P) rhabdovirus ve paramyxovirüs (pneumovirinae için ek olarak M2-1) genom replikasyonları için yeterli olduğunu göstermiştir. Filoviridae ailesindeki Marburg virus için L, NP ve VP35 (fosfoproteine eşdeğer) minimal replikasyon ünitesini oluştururken (Mühlberger ve ark., 1998), Ebola virüste ise bunlara ilaveten VP30 proteinine ihtiyaç duyulmaktadır (Mühlberger ve ark., 1999). Aksine bünyavirüs veya arenavirüslerde ise transkripsiyon ve replikasyon için L ve NP yeterlidir (Dunn ve ark., 1995, Lee ve ark., 2000). T7 polimeraz sistemi sitoplazmada transkribe olan HeV, NiV, MeV, SeV, RabV, Ebola, Marburg, Newcastle, HPIV-3 (Şekil-1), RSV, VSV, LCMV gibi (-)RNA virüslerini kurtarmak için sıkça tercih edilmektedir. Daha iyi sonuç

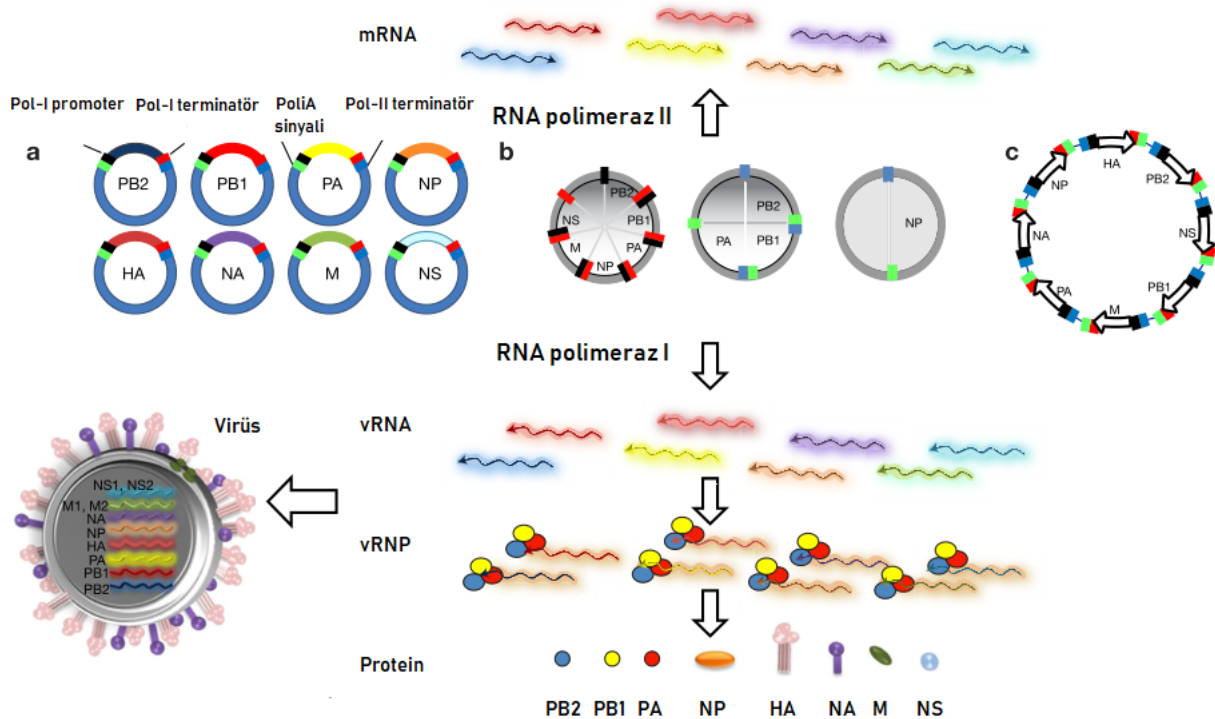
alındığı için elde edilen cDNA'ların antigenom oryantasyonu ile plazmide yerleştirilmesi şeklinde sistem modifiye edilmiştir (Schnell ve ark., 1994). Eğer T7 polimeraz sistemi çekirdek lokalizasyon sinyalleri ile kombine edilirse çekirdekte replike olan influenza virüslerin kurtarılması da mümkün olabilmektedir (de Wit ve ark., 2007). Polimeraz-I (Pol-I) enzimine dayalı sistemlerin aksine T7 polimeraz sistemlerin dezavantajı elde edilen transkriptlerin 5' ve 3' uçlarına virüste bulunmayan GGG kalıntısının eklenmesidir. Bu kalıntılar etkili şekilde ribonükleoprotein kompleksi oluşumuna müdahalede etmektedir. Dolayısıyla transkripsiyon esnasında eklenen nonviral nükleotitlerin otokatalitik ribozimlerle kesimine ihtiyaç duyulmuştur. Le Mercier ve ark (2002) çekiç baş ribozim kullanarak tam 5' uç oluşturmada başarılı olmuştur. Ayrıca tam 3' uç üretmek için HDV ribozim eklentisi kullanılmış ve 100 kat daha etkili kurtarma sağlanmıştır.

Pol-I ve Pol-II sistemi/Çekirdekte Transkripsiyon: RNA polimeraz I enzimi (Pol-I), 5' cap ve 3' poliA yapılarından yoksun ribozomal RNA'yı sentezlemekle görevli çekirdekçi enzimidir (Hoffmann ve ark., 2000). Pol-I dayalı virüs kurtarma sistemleri Uukuniemi, Influenza, Thogoto, Borna disease, kızamık ve Ebola virüslerine başarılı şekilde uygulanmış olsa da çekirdekte replike olan RNA virüsleri için daha çok uygunluk göstermektedir. Influenza virüs ve bornavirüsler hücre çekirdeğinde çoğalmaktadır. Influenza virüsler transkripsiyonel faaliyet için viral genomik RNA, NP ve viral RNA polimerazdan (PB1, PB2 ve PA) ibaret fonksiyonel olarak aktif viral RNP kompleksine ihtiyaç duymaktadır (Lamb & Krug, 2001, de la Torre, 2001). İlk influenza virüs kurtarma girişimleri in vitro bir araya getirilen tek bir RNP kompleksinin yardımcı influenza virüsle enfekte hücreye transfekte edilmesine dayanmaktadır (Luytjes ve ark., 1989). İkinci bir uygulama olarak yardımcı virüsle enfekte hücelerde tek influenza virüs segmentine ait vRNA kodlayan cDNA'nın pol I promotör ve terminatör dizileri arasına yerleştirilerek hücreye transfekte edilmesi ile başarılıdır. Ancak bu sistemlerde enfektif rekombinant virüslerin ortamdan izolasyonu zordur ve antikör aracılı kısıtlama, ısı duyarlılığı veya ilaç direnci gibi güçlü seleksiyon sistemlerine ihtiyaç vardır (Barclay & Palese., 1995, Enami ve ark., 1991, Castrucci & Kawaoka, 1995, Neumann & Kawaoka, 2004).

RNA polimeraz II (Pol-II) enzimi, mRNA'nın ve küçük çekirdek RNA'larının transkripsiyonundan sorumlu esas ökaryotik hücre transkriptazıdır. Influenza virüs kurtarma



Şekil 1. Segmentsiz negatif anlamlı HPIV3 RNA virüsünün T7 RNA polimeraz sistemi ile kurtarılması. 1) T7 polimeraz ekspres eden vaccinia virüs vTF7-3 ile hücrelerin enfekte edilmesi. 2) T7 RNA polimeraz promotör kontrolü altında genomik RNA'yı sentezleyen plazmidin NP, L ve P proteini ekspres eden plazmidlerle kotransfeksiyonu. 3) gRNA'nın NP ile kapsitlenmesi 4) RNP kompleks oluşumu. 5) Viral replikasyonun uyarımı ve 6) enfektif virionun oluşumu (Jason, 2009)



Şekil 2. Sekiz, üç ve tek plazmidten oluşan influenzavirüs reverz genetik sistemleri. a) Sekiz plazmid içeren reverz genetik sistemi. Sekiz viral segmentten birini kodlayan cDNA insan pol-I promotörü ile fare pol-I terminatörü arasında yerleştirilmiştir. Pol-I kaseti daha sonra hCMV pol-II promotörü ve poliadenilasyon sinyaline tutturulmuştur. b) Üç plazmid içeren reverz genetik sistemi. Plazmidlerden biri sekiz viral segmentin tamamının cDNA'sını içermekte ve Pol-I promotör ve terminatör dizilere yerleştirilmiştir. Diğer plazmid PB2, PB1 ve PA kodlayan cDNA'ların mRNA'ya transkripsiyonun sağladığı pol-II kasetinden oluşmaktadır. Üçüncü plazmid ise NP'nin pol-II transkripsiyon ünitesini taşımaktadır. c) Tek plazmid sistemi. Tek bir ekspresyon plazmidine sekiz viral segment için sekiz pol-II kasetinden oluşmaktadır (Ye ve ark., 2014)

sistemlerinde RNA pol II sitomegalovirüs promotörlerinden viral mRNA transkripsiyonunu başlatmak için faydalanılmaktadır (Hoffmann ve ark., 2000).

Influenza A virüsün tümüyle klonlanmış cDNA'dan kurtarma girişiminde, her bir segmente ait vRNA'ları kodlayacak cDNA'nın Pol-I promotör ve terminatör dizileri içeren plazmide aktarılması gerekmektedir. İlâveten NP ve üç polimeraz alt ünitesine (PB1, PB2 ve PA) ait mRNA'ları üretmek için de cDNA yapısındaki genetik kodların Pol-II promotör ve poliA dizileri taşıyan plazmidlere aktarılması gerekmektedir. Böylece toplamda 12 plazmide gereksinim duyulmaktadır (Neumann ve ark., 1999).

Hoffmann ve ark (2000) influenza A segmentlerini çift yönlü olarak (ambisens) transkripsiyon üniteleri içerisine klonlayarak yenilikçi bir yaklaşım geliştirmiştir. RNA Pol-I ve Pol-II sisteminin aynı plazmide yer aldığı bu sistem RNA Pol-I/II olarak tanımlanmakta ve RNA pol-I sisteminin modifiye edilmiş halini temsil etmektedir. Influenzavirüs viral RNA'ları kodlayan cDNA'lar 5' uçtaki RNA polimeraz I promotörü ile 3' uçtaki polimeraz I terminatörü arasında negatif oryantasyonla, RNA polimeraz II promotörü ile poliadenilasyon bölgesi arasında pozitif oryantasyonla klonlanmıştır. İki transkripsiyon ünitesinin oryantasyonu tek cDNA şablonundan RNA pol-I enzimi ile negatif anlamlı vRNA sentezine, RNA pol-II enzimi ile pozitif anlamlı mRNA üretimine izin vermektedir. Bu yaklaşım ile 12 olan plazmid ihtiyacı 8'e düşmüştür. Plazmid sayısının azalması yüksek seviyede transfeksiyon etkinliği için daha elverişli olmuştur. Son olarak, 8 viral RNA'nın tek bir plazmidden kodlanması gibi farklı yaklaşımlar denenmiş ve transfekte hücrelerde enfeksiyöz virüs üretimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2) (Neumann ve ark., 2005, Zhang ve ark., 2009).

Özellikle segmentli genoma sahip virüslerde birden fazla klonun aynı hücreye transfekte edilmesi gerekmektedir. Ancak bu, daha iyi transfeksiyon ajanı (nontoksik) ve transfekte edilebilir hücre hattı kullanımıyla mümkün olabilmektedir. Bazı araştırmacılar, yüksek seviyede rekombinant virüs üretimini yüksek etkinlik gösteren elektroporasyon yöntemiyle karşılamıştır (Surman ve ark., 2007). Nucleofector™, primer ve embriyonik hücrelerin çekirdeğine direk olarak DNA ve RNA aktarımını sağlayabilmektedir (www.lonza.com). HEK 293 gibi hücre hatları yüksek transfeksiyon etkinliğine sahiptir. Hücre hattı seçimi transfeksiyon etkinliği yanı sıra virüsün çoğalma göstermesiyle de yakından ilişkilidir.

Virülens Genlerin Belirlenmesi ve Aşı Üretimi

Geçmişteki yüksek başarıya rağmen inaktivasyon ya da pasajlama ile (forward genetik) atenüasyon gibi geleneksel yaklaşımlar, rasyonel hedefli mutasyonlardan (reverz genetik) elde edilen aşı adaylarından daha az etkili olabilmektedir (Stobart & Moore, 2014).

Reverz genetik, viral genler üzerinde hedeflenen değişikliklerin yapılmasına ve değişen genlerle birlikte virüsün kurtarılmasına imkan tanımaktadır. En önemlisi de RNA virüslerinde bu değişikliklerin başarılı olabilmiş olmasıdır. Gen veya viral diziler üzerinde değişiklikler yapılarak o genin fonksiyonu araştırılabilmektedir (Sola ve ark., 2003). Paramyxovirüslerde aksesuar proteinlerin interferon karşıtı aktiviteye sahip olduğu ve patojenitede önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Aksesuar proteinleri kodlayan genlerin susturulması pratik bir yöntemdir ve bu proteinlerin eksikliğinde de virüs yüksek seviyede çoğalmaya devam etmektedir (Goodbourn ve ark., 2000, Gotoh ve ark., 2002, Poole ve ark., 2002, Child ve ark., 2007, Andrejeva ve ark., 2004). Rekombinant Newcastle virüsün aksesuar proteinlerden V proteini düşük seviyede eksprese etmesi immunojenik ve düşük patojeniteli aşı adayının ortaya çıkmasını sağlamıştır (Mebatsion ve ark., 2001). Benzer şekilde V geni içermeyen HPIV2 ve C geni içermeyen HPIV-1'in in vivo ortamda önemli şekilde atenüe olduğu görülmüştür (Bartlett ve ark., 2008, Schaap-Nutt ve ark., 2010). T7 polimeraz dayalı reverz genetik sistemleri ile üretilen HeV ve NiV'ün patojenite çalışmalarında aksesuar V, W veya C geni eksikliğinde replikasyonun devam ettiği, baskılanmaları durumunda ise virüsün atenüe hale geçtiği görülmüştür (Yoneda ve ark., 2010, Andrejeva ve ark., 2004). T7 ve Pol-I dayalı reverz genetik sistemiyle üretilen rekombinant EBOV'e ait VP24, VP35, NP ve G proteinin patojenitede önemli rol aldığı ortaya konmuştur (Halfmann ve ark., 2008, Halfmann ve ark., 2009, Ebihara ve ark., 2006).

Isıya duyarlı mutasyonlar oluşturularak virüs atenüasyonun sağlanması aşı üretiminde farklı bir yöntemdir. İnterferon karşıtı NS geni çıkarılmış ve ısıya duyarlı mutasyonlarla atenüe edilmiş rekombinant respiratorik sinsityal virüs (RSV) iyi bir aşı adayı olarak karşımıza çıkmaktadır (Luongo ve ark., 2013, Bossert ve ark., 2003).

Atenüe aşuların hazırlanmasında mevcut bir başka yaklaşım kodon deoptimizasyonudur. Bu yaklaşımda gen üzerinde türe özgü olarak sık bulunan kodonlar daha az varlık gösteren kodonlarla değiştirilmektedir. Vahşi tip ile aynı amino asit dizisinin sentezlenmesi, immün

yanıtın değişmemesi, atenüasyon kaybının mümkün olmaması ve diğer atenüasyon metodları ile kombine edilebilmesi gibi bazı avantajları mevcuttur. Bu yöntemle poliovirüs aşısı hazırlanmış ve atenüasyon farelerde ispat edilmiştir (Burns ve ark., 2006, Mueller ve ark., 2006).

Negatif anlamlı segmentsiz virüslerde 5' uca yakın genler daha az transkripsiyona uğramakta ve bu genlerden protein sentezi daha düşük miktarda yapılmaktadır. Dolayısıyla bir genin farklı bir bölgeye taşınması protein ekspresyon seviyesini değiştirerek viral replikasyonu ve virülensi azaltabilmektedir. Ör: VSV N geninin genomdaki ilk pozisyonundan aşağı akış (downstream) yönünde kaydırılması ile rekombinant VSV'nin in vitro çoğalmasının ve patojenitesinin azaldığı bildirilmiştir. Benzer bir uygulama kuduz P protein geni için denenmiş ve başarılı olunmuştur. Bu mutantlarda genlerin tekrar yer değiştirme ihtimali bulunmadığından çok istikrarlı atenüasyon fenotipi oluşturmaktadır (Flanagan ve ark., 2001, 2003, Wertz ve ark., 1998).

Reverz genetik sistemlerin kullanımına yönelik bir diğer yaklaşım replikasyon defektli virüslerin üretilmesidir. Bu virüslerin replikasyonu engelleyici bir veya birkaç geni çıkarılmakta ve eksik genler stabil hücre hatlarından karşılanmaktadır. BSL-4 seviyesinde çalışma gerektiren EBOV gibi yüksek patojenik virüslerin daha düşük güvenlik seviyesinde çalışmasına izin vermektedir. Replikasyon defektli virüsler kültür ortamında çoğalma gösterirken in vivo çoğalma göstermezler böylece aşı adayı olarak görev görebilmektedir. Yapılan çalışmalarda transkripsiyon için esansiyel VP30 geni çıkarılmış replikasyon kusurlu EBOV fare ve kobaylarda koruyucu yanıt ortaya koymuştur. EBOV çalışmaları da VP30 proteini eksprese eden kalıcı transfekte hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir. (Halfmann ve ark., 2008, Mühlberger ve ark., 1998, Mühlberger ve ark., 1999, Watt ve ark., 2014, Wengenrath ve ark., 2010) Yine T7 polimeraz dayalı reverz genetik sistemlerinde M ve P geni bulunmayan kuduz virüsü üretilmiştir. Bu genlerin yerine G geni iki kez kodlanmıştır. İnsan dışındaki primatlarda nötralizan antikor yanıt uyaran bu virüs laboratuvar ortamında M ve P proteini eksprese eden hücre hatlarında çoğaltılmaktadır. Bu tür aşılar reversiyon riski söz konusu değildir (Cenna ve ark., 2009).

Influenza virüsün konak hücreye tutunmasında terminal sialik asitle etkileşen ve füzyonla RNP'lerin salınımını sağlayan HA glikoproteini reverz genetik çalışmaları ile

iyi karakterize edilmiş virülens faktörlerinden biridir (Wiley & Skehel, 1987, Han ve ark., 2001). Etkili bir füzyon için HA'nın HA1 ve HA2 alt üniteye bölünmüş olması gerekmektedir (Bertram ve ark., 2010). Viral replikasyon için önem arz eden bu işlem konak hücresi tarafından üretilen enzimlerle sağlanmaktadır. İnsan mevsimsel gripi ve düşük patojeniteli kanatlı gripi virüslerinde bölünme tekli arjinin kalıntısında meydana gelmektedir (Bertram ve ark., 2010, Böttcher ve ark., 2006). Bu sebeple bu virüsler bu bazik kalıntıyı tanıyan enzimin bulunduğu konak dokularında sınırlı olarak kalmaktadır (Bertram ve ark., 2010, Zhirnov ve ark., 2002) Yüksek virülensli alt tiplerin HA proteininde birden fazla bazik aminoasit kalıntıları ve bölünme bölgeleri bulunmuştur (Horimoto ve ark., 1995, Senne ve ark., 1996). H5N2'deki bu bölgelerin tavuklardaki viral patogeneze etkisi reverz genetik ile çalışılmıştır. Bu çalışmada HA proteininde bazik aminoasit kalıntı sayısının dörtten daha fazla olduğu virüslerde letalitenin arttığı ve virüsün nöronlarla beyine ve kan ile sistemik organlara yayıldığı görülmüştür (Hatta ve ark., 2001, Schrauwen ve ark., 2012, Suguitan ve ark., 2012) İnfluenza virüsler mevsimsel aşı uygulamasını gerektirmektedir ve uygun formülasyonun belirlenmesi, gelişimi ve uygulanması biraz zaman almaktadır. Reverse genetik teknolojisindeki yeni gelişmeler, kurtarma ve üretime ayrılan zamanı aylardan haftalara düşürmektedir. Dormitzer ve ark. (2013), 5 gün gibi kısa süre içerisinde reverse genetik teknolojisi ile yeni HA ve NA dizilerinden rekombinant influenzavirüs üretmeyi başarmıştır. Bu teknoloji canlı influenza aşı adaylarının üretiminde kullanılan reassortant virüslerin oluşturulmasında da kullanılabilir. Böylece donör tohum virüsün (A/Ann Arbor/6/60 (H2N2)) 6 gen segmentini içeren ve mevsimsel gribe ait HA ve NA yüzey proteinlerini içeren aşılar hızla hazırlanabilmektedir.

Influenza A virüs viral NS1 proteinlerin eksilmesi veya silinmesi ile tamamı atenüe edilebilmektedir. Bu rekombinant influenza virüslerin fare, at, domuz, kuş ve makaklarda burun içi aşılama sonrasında koruyucu immün yanıt önemli bir biçimde uyarabilmektedir. Bu nedenle harika bir aşı adayı olarak nitelendirilmektedir. Influenza B virüsü için de aynı denemeler sonrasında benzer sonuçlar alınmıştır (Steel ve ark., 2009, Richt & Garcia-Sastre, 2009).

Kanatlı influenza virüs alt tiplerinden H5N1 ve H9N2 pandemik potansiyele sahiptir. Fakat H5N1 inaktif aşıları edinsel yanıt sınırlı şekilde ortaya çıkmakta ve canlı aşılar ise sirküle H5N1 ile aşı suşu arasındaki

reassortment ihtimali endişe yaratmaktadır (Perez ve ark., 2003, Perez & Garcia-Sastre, 2013). Bu endişeleri ortadan kaldırmak için H5N1 ve H9N2'ye karşı bivalent canlı influenza aşısı viral genom düzenlemesi yapılarak üretilmiştir. Bu amaçla çekirdek transfer proteini (NEP) H9N2 virüsün NS viral segmentinden çıkarılmış ve PB1'in sonuna eklenmiştir. H9N2'nin çıkarılan NEP geni lokasyonuna ise H5N1 virüsün HA geni yerleştirilmiştir. H5N1 virüs HA geni taşıyan yeniden düzenlenmiş H9N2 virüsü H5N1 çelincine karşı tam koruma sağlamıştır. Son olarak modifiye M ve/veya NS segmentlerini içeren rekombinant influenza A H1N1 virüsü üretimi gerçekleştirilmiştir (Pena ve ark., 2013).

Influenza virüs HA geni antijenik drift ve shifte oldukça duyarlıdır. Bu üniversal bir aşı geliştirme durumunu olumsuz etkilemektedir. İnfluenza virüs M2 proteine karşı birçok türde koruyucu yanıt ortaya çıkmıştır. Bu protein ile üniversal bir aşı hedeflenebilmektedir (Nogales ve ark., 2016).

Umut vaat eden bir diğer yaklaşım vahşi tip virüse morfolojik olarak benzerlik gösteren yüksek immunojeniteli virüs benzeri partiküllerin (VLP) hazırlanmasıdır. VLP'ler viral genom içermediklerinden dolayı güvenli olduğu ve güçlü edinsel yanıtı ortaya çıkardığı kabul edilmektedir. VLP'lerin üretiminde influenza virüsler için tek başına HA ve NA proteini yeterli olmasına rağmen yaygın olarak HA, NA ve M1'in ekspresyonu ile oluşturulmaktadır (Treanor ve ark., 2007, Chen ve ark., 2007). Pushko ve ark. (2011) pandemik alt tip VLP (H5N1, H7N2 ve H2N3) ve mevsimsel VLP'nin (H1N1, H3N2 ve B) ferretlerde nötralizan antikor üretimini uyardığı ve çelince karşı koruma sağladığını göstermiştir.

Rapörtör Gen İle Viral Döngü Ve Patogenezin Daha İyi Anlaşılması

Reverz genetik çalışmalarında kullanılan rapörtör genler lusiferaz, chloramphenicol acetyl transferase (CAT) ve ultrviole ışık altında floresan ışımaya yapan green fluorescent protein (GFP)'dir. Viral genomların modüler yapısı, rapörtör genlerin aktarımını kolaylaştırarak virüs reverz genetiğindeki ilerlemelere hız kazandırmıştır. Raportör genlerle desteklenmiş minigenom deneyleri, tüm virüs kurtarma girişimi öncesinde sistemin durumu hakkında araştırmacıya bilgi vermektedir (Fearn & Collins, 1999, Gauthier ve ark., 2006).

Rapörtör genlerin viral genlerle aynı oryantasyonda klonlanması ve transkripsiyondan önce transkripsiyona uğramaları gerekmektedir. Lusiferaz veya CAT gibi nicel rapörtör genlerin tercih edilmesi halinde

replikasyon proteinlerini kodlayan plazmidlerin miktarı ve oranları optimize edilebilmektedir. Eğer GFP gibi nitel rapörtör gen tercih edilirse transfekte veya enfekte hücreleri görselleştirmek mümkün hale gelmektedir. Rapörtör genler ile rekombinant virüsün organizmadaki dağılımı, moleküler ve hücresel seviyedeki tropizmi, patogenezi, immun yanıtı kontrol eden hücresel proteinlerle etkileşimi değerlendirilebilmektedir. Transkripsiyon başlama-durma sinyallerini içeren genler arası bölgelerin fonksiyon ve karakteristikleri, promotör bölge yapıları ve ek nükleotitlerin promotör faaliyetini daha yüksek seviyeye çıkarıp çıkarmadığını veya bunların replikasyona üzerindeki etkileri rapörtör genler ile ortaya çıkarılabilmektedir. Ayrıca genomun replikasyonu, transkripsiyonu, kapsidasyonu ve virion morfogenezini için gerekli trans-acting protein ve cis-acting yapıların yerleşim ve sınırları da rapörtör genler yardımıyla belirlenebilmektedir (Bridgen & Elliott, 1996, Jackson ve ark., 2011, Stobart & Moore, 2014, Kelly & Strick, 2000, Wickersham ve ark., 2013).

Antiviral Uygulamalar

Viral replikasyonun ölçümü antivirallerin in vitro taraması açısından önem arz etmektedir. Luciferaz veya asetil transferazlar gibi rapörtör gen taşıyan tam uzunluktaki klon sistemleri veya yaşam döngü modellemeleri replikasyonun ölçümü ve potansiyel antivirallerin belirlenmesine izin vermektedir. Laboratuvar ortamında test edilen ve viral çoğalmayı durduran antiviraller viral enfeksiyonların tedavisi adına umut vaat edici olmuştur (Jason, 2009, Pegoraro & Bavari, 2012). Gen terapisi ve viral hastalıkların tedavisi noktasında başvuru uygulamalardan bir diğeri hücrede hedef bölgelere yönelik interferens RNA'ların (RNAi) sentezletilmesidir. Doğal hücre savunmasının taklit edildiği bu uygulamada hedef genlerin transkripsiyonu esnasında oluşan mRNA'lar ile tasarlanan komplementer RNA'ların dsRNA oluşturması beklenmektedir. Böylece mRNA yapıları ribozomlara ulaşamayacak ve hücresel dicer molekül kompleksleri ile 22 nükleotitlik parçalara dilimlenerek etkisiz hale getirilecektir. İnfluenza virüse karşı profilaktik etki amacıyla enfeksiyondan önce veya enfeksiyonun erken döneminde interfere RNA'ların yeterli konsantrasyonda inhalasyon yoluyla verilerek enfeksiyon bertaraf edilebilme yetisine sahip olduğu görülmüştür. Benzer sonucun Hepatitis C virüsü ile enfekte olmuş hastalara interfere RNA'ların transfekte edilmesi sonucunda ulaşıldığı bildirilmektedir. Ebola virus ve hepatit B virüs çalışılan diğer virüsler arasındadır (Tan & Yin, 2004, Levanova & Poranen, 2018).

Sonuç olarak reverz genetik, tıbbi ve ekonomik açıdan önemli virüsleri incelemek için kullanılabilir bir laboratuvar yöntemi haline gelmiştir. Virüs yaşam döngüsü, virüsün kurgulanması, viral proteinlerin patojenlikteki rolü ve viral proteinlerin konakçı hücre immün yanıt bileşenleri ile etkileşimi için güçlü bir araç sağlamaktadır. Reverz genetik sisteminin geliştirilmesi RNA ve DNA virüs genomunda tasarlanmış mutasyon oluşturma, nükleotit dizisi ekleme ve çıkarma uygulamalarını mümkün kılarak viroloji alanında devrim yaratmıştır. Bu sistem virüs atenuasyonu, konak özgülüğünün değiştirilmesi ve replikasyon defektli virüslerin üretiminde, nükleotit dizilerin yapı ve fonksiyonlarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek patojenik virüslerin daha düşük güvenlik seviyesinde çalışmasına izin veren defektif, florasan veya lüminesen rapörtör genleri barındıran rekombinant formları antiviral ajanların veya nötralizan antikorların test edilmesine imkan tanımaktadır. Tek döngülü virüsler antiviral ve NA'ların belirlenmesinde vahşi virüslerin yerini tutan harika bir alternatiftir. Ayrıca güvenli, immunojenik ve koruyucu aşı ve/veya aşı vektörleri için harika bir seçenek sunmaktadır. Günümüzde, reverz genetik, viral genomları manipüle ederek bilinmezliklerin ortaya çıkarılması veya *-iyi virüs-* üretiminde rutin olarak kullanılmaktadır. Gelecekte virüs evrimi ile ortaya çıkacak yeni, yüksek patojenik ajanların irdelenmesi ve bu ajanlara yönelik koruyucu tedbirlerin hızla alınmasında reverz genetikçilere büyük sorumluluklar düşmektedir.

Kaynaklar

Almazan F, DeDiego ML, Sola I, Zuniga S, Nieto-Torres JL, Marquez-Jurado S, Andres G, Enjuanes L (2013) Engineering a replication-competent, propagation-defective middle east respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *mBio* 4:e00650–e00613. <https://doi.org/10.1128/mBio.00650-13>.

Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, Randall RE (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17264–17269. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407639101>.

Balint A, Farsang A, Zadori Z, Hornyak A, Dencso L, Almazan F, Enjuanes L, Belak S (2012) Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. *J Virol* 86:6258–6267. <https://doi.org/10.1128/JVI.00189-12>.

Barbanti-Brodano G, Swetly P, Koprowski H (1970) Early events in the infection of permissive cells with simian virus 40: adsorption, penetration, and uncoating. *J Virol* 6:78-86.

Barclay WS, Palese P (1995) Influenza B viruses with site-specific mutations introduced into the HA gene. *J Virol* 69:1275-1279.

Bartlett EJ, Cruz, AM, Esker J, Castano A, Schomacker H, Surman SR, Hennessey M, Boonyaratanakornkit J, Pickles RJ, Collins PL, Murhpy BR, Schmidt AC (2008) Human parainfluenza virus type 1C proteins are nonessential proteins that inhibit the host interferon and apoptotic responses and are required for efficient replication in nonhuman primates. *J Virol* 82:8965–8977. <https://doi.org/10.1128/JVI.00853-08>.

Bayou K. (2017) Current techniques and applications of reverse genetics: an overview. *International Journal of Genetics* 7:31-37. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijg.2017.31.37>.

Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Köhl A, Pöhlmann S (2010) Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. *Rev Med Virol* 20:298-310. <https://doi.org/10.1002/rmv.657>.

Bossert B, Marozin S, Conzelmann KK (2003) Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 77:8661-8668. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.8661-8668.2003>.

Boyer JC, Haenni AL (1994) Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* 198:415–426. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1053>

Böttcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk HD, Garten W, Matrosovich M. (2006) Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* 80:9896-9898. <https://dx.doi.org/10.1128%2FJVI.01118-06>

Bridgen A, Elliott R M (1996) Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15400–15404. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15400>.

Buchholz CJ, Spohner D, Drillien R, Neubert WJ, Homann HE (1993) The conserved N-terminal region of Sendai virus nucleocapsid protein NP is required for nucleocapsid assembly. *J Virol* 67:5803-5812. [https://doi.org/0022-538X/93/105803-10\\$02.00/0](https://doi.org/0022-538X/93/105803-10$02.00/0)

Buchholz UJ, Finke S, Conzelmann KK (1999) Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* 73:251–259.

Buchman AR, Burnett L, Berg P (1981) DNA tumor viruses. In: Weiss RA, Teich NM, Varmus HF, Coffin JM. (eds) *The Molecular Biology of Tumor Viruses*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Press, New York, pp 799-841.

Burns CC, Shaw J, Campagnoli R, Jorba J, Vincent A, Quay J, Kew O (2006) Modulation of poliovirus replicative fitness in hela cells by deoptimization of synonymous codon usage in the capsid region. *J Virol* 80:3259–3272. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3259-3272.2006>

Castrucci MR, Kawaoka Y (1995) Reverse genetics system for generation of an influenza A virus mutant containing a deletion of the carboxyl-terminal residue of M2 protein. *J Virol* 69:2725-2728.

Cenna J, Hunter M, Tan GS, Papaneri AB, Ribka EP, Schnell MJ, Marx PA, McGettigan JP (2009) Replication-deficient rabies virus-based vaccines are safe and immunogenic in mice and nonhuman primates. *J Infect Dis* 200:1251-1260. <https://dx.doi.org/10.1086%2F605949>.

Chen BJ, Leser GP, Morita E, Lamb RA (2007) Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J Virol* 81:7111–7123. <https://doi.org/10.1128/JVI.00361-07>.

- Childs K, Stock N, Ross C, Andrejeva J, Hilton L, Skinner M, Randall R, Goodbourn S (2007)** mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins. *Virology* 359:190-200. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.09.023>.
- Collins PL, Hill MG, Camargo E, Grosfeld H, Chanock RM, Murphy BR (1995)** Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11563–11567. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11563>.
- Conzelmann KK (1998)** Nonsegmented negative-strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes. *Annu Rev Genet* 32:123–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.32.1.123>.
- de la Torre JC (2001)** Bornaviridae. In: DM Knipe, PM Howley (eds) *Fields Virology*, 4th edn. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1669-1678.
- de Wit E, Spronken MI, Vervaeke G, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA (2007)** A reverse-genetics system for Influenza A virus using T7 RNA polymerase. *J Gen Virol* 88:1281-1287. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82452-0>.
- DeDiego ML, Alvarez E, Almazan F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, Shieh WJ, Zaki SR, Subbarao K, Enjuanes L (2007)** A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol* 81:1701–1713. <https://doi.org/10.1128/JVI.01467-06>.
- Dormitzer PR, Suphaphiphat P, Gibson DG, Wentworth DE, Stockwell TB, Algire MA, Alperovich N, Barro M, Brown DM, Craig S, Dattilo BM, Denisova EA, De Souza I, Eickmann M, Dugan VG, Ferrari A, Gomila RC, Han L, Judge C, Mane S, Matrosovich M, Merryman C, Palladino G, Palmer GA, Spencer T, Strecker T, Trusheim H, Uhlendorff J, Wen Y, Yee AC, Zaveri J, Zhou B, Becker S, Donabedian A, Mason PW, Glass JI, Rappuoli R, Venter JC (2013)** Synthetic generation of influenza vaccine viruses for rapid response to pandemics. *Sci Transl Med* 5:185ra68. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006368>.
- Dunn EF, Pritlove DC, Jin H, Elliott RM (1995)** Transcription of a recombinant bunyavirus RNA template by transiently expressed bunyavirus proteins. *Virology* 211:133-143. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1386>.
- Ebihara H, Takada A, Kobasa D, Jones S, Neumann G, Theriault S, Bray M, Feldmann H, Kawaoka Y (2006)** Molecular determinants of Ebola virus virulence in mice. *PLoS Pathog* 2:e73. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020073>.
- Elroy-Stein O, Moss B (1990)** Cytoplasmic expression system based on constitutive synthesis of bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6743–6747.
- Enami M, Sharma G, Benham C, Palese P (1991)** An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* 185:291-298. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90776-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90776-8).
- Fearn R, Collins PL (1999)** Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* 73:5852–5864.
- Ferko B, Stasakova J, Romanova J, Kittel C, Sereinig S, Katinger H, Egorov A (2004)** Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. *J Virol* 78:13037–13045. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.23.13037-13045.2004>.
- Flanagan EB, Schoeb TR, Wertz GW (2003)** Vesicular stomatitis viruses with rearranged genomes have altered invasiveness and neuropathogenesis in mice. *J Virol* 77:5740–5748. <https://doi.org/10.1128%2FJVI.77.10.5740-5748.2003>.
- Flanagan EB, Zamparo JM, Ball LA, Rodriguez LL, Wertz GW (2001)** Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host: new strategy for vaccine development. *J Virol* 75:6107-6114. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.13.6107-6114.2001>.
- Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, Palese P, Brownlee GG, Garcia-Sastre A (1999)** Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *Journal of Virology* 73:9679–9682.
- Friedman H, Macarak EJ, MacGregor RR, Wolfe J, Kefalides NA (1981)** Virus infection of endothelial cells. *J Infect Dis* 143:266-273. <https://doi.org/10.1093/infdis/143.2.266>.
- Gauliard N, Billecocq A, Flick R, Bouloy M (2006)** Rift Valley fever virus noncoding regions of L, M and S segments regulate RNA synthesis. *Virology* 351:170–179. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.03.018>.
- Goff SP and Berg P (1976)** Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell* 9:695-705.
- Goodbourn S, Didcock L, Randall RE (2000)** Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 81:2341–2364. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-10-2341>.
- Gotoh B, Komatsu T, Takeuchi K, Yokoo J (2002)** Paramyxovirus strategies for evading the interferon response. *Rev Med Virol* 12:337–357. <https://doi.org/10.1002/rmv.357>.
- Griffiths JFA, Wessler SR, Levontin RC, Gelbart WM, Suzuki DT, Miller JH (2004)** Introduction to Genetic Analysis. Freeman, W. H. & Company, Los Angeles.
- Halfmann P, Ebihara H, Marzi A, Hatta Y, Watanabe S, Suresh M, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y (2009)** Replication deficient ebolavirus as a vaccine candidate. *J Virol* 83:3810–3815. <https://doi.org/10.1128/JVI.00074-09>.
- Halfmann P, Kim JH, Ebihara H, Noda T, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y (2008)** Generation of biologically contained Ebola viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1129–1133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708057105>.
- Han X, Bushweller JH, Cafiso DS, Tamm LK (2001)** Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat Struct Biol* 8:715-720. <https://doi.org/10.1038/90434>.
- Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y (2001)** Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293:1840-1842. <https://doi.org/10.1126/science.1062882>.
- Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG (2000)** A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6108–6113. <https://doi.org/10.1073/pnas.100133697>.
- Horimoto T, Rivera E, Pearson J, Senne D, Krauss S, Kawaoka Y, Webster RG (1995)** Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *Virology* 213:223-230. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1562>.
- Jackson D, Elderfield RA, Barclay WS (2011)** Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era. *J Gen Virol* 92:1–17. <https://doi.org/10.1099/vir.0.026187-0>.

- Jason PR** (2009) The Use of Reverse genetics to clone and rescue infectious, recombinant human parainfluenza type 3 viruses. All Graduate Theses and Dissertations. 467.
- Jones N, Shenk T** (1978) Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5. *Cell* 13:181-188. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90275-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90275-7).
- Kelly RM, Strick PL** (2000) Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *J Neurosci Methods* 103:63-71. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00296-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00296-X).
- Lamb RA, Krug RM** (2001) Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE (eds) *Fields Virology*, 4th edn. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 1487-1531.
- Le Mercier P, Jacob Y, Tanner K, Tordo N** (2002) A novel expression cassette of lyssa virus shows that the distantly related Mokola virus can rescue a defective rabies virus genome. *J Virol* 76:2024-2027. <https://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.4.2024-2027.2002>.
- Lee KJ, Novella IS, Teng MN, Oldstone MB, de la Torre JC** (2000) NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J Virol* 74:3470-3477. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.8.3470-3477.2000>.
- Levanova A, Poranen MM** (2018) RNA Interference as a Prospective Tool for the Control of Human Viral Infections. *Front Microbiol* 9:2151. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02151>.
- Luong C, Winter CC, Collins PL, Buchholz UJ** (2013) Respiratory syncytial virus modified by deletions of the NS2 gene and amino acid S1313 of the L polymerase protein is a temperature-sensitive, live-attenuated vaccine candidate that is phenotypically stable at physiological temperature. *J Virol* 87:1985-1996. <https://doi.org/10.1128/JVI.02769-12>.
- Luytjes W, Krystal M, Enami M, Pavin JD, Palese P** (1989) Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* 59:1107-1113. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90766-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90766-6).
- Mackett M, Smith GL, Moss B** (1982) Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:7415-7419. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.23.7415>.
- Mebatsion T, Verstegen S, De Vaan LTC, Römer-Oberdörfer A, Schrier CC** (2001) A Recombinant Newcastle Disease Virus with Low-Level V Protein Expression Is Immunogenic and Lacks Pathogenicity for Chicken Embryos. *J Virol* 75:420-428. <https://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.1.420-428.2001>.
- Mueller S, Papamichail D, Coleman JR, Skiena S, Wimmer E** (2006) Reduction of the rate of poliovirus protein synthesis through large-scale codon deoptimization causes attenuation of viral virulence by lowering specific infectivity. *J Virol* 80:9687-9696. <https://dx.doi.org/10.1128/JVI.00738-06>.
- Mundt E, Vakharia VN** (1996) Synthetic transcripts of double-stranded Birnavirus genome are infectious. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11131-11136. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11131>.
- Mühlberger E, Lötfering B, Klenk HD, Becker S** (1998) Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes *J Virol* 72:8756-8764.
- Mühlberger E, Weik M, Volchkov VE, Klenk HD, Becker S** (1999) Comparison of the Transcription and Replication Strategies of Marburg Virus and Ebola Virus by Using Artificial Replication Systems *J Virol* 73:2333-2342.
- Neumann G, Fujii K, Kino Y, Kawaoka Y** (2005) An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16825-16829. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.0505587102>.
- Neumann G, Kawaoka Y** (2004) Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 283:43-60.
- Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G, Kawaoka Y** (1999) Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9345-9350. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9345>.
- Neumann G, Whitt MA, Kawaoka Y** (2002) A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA-what have we learned? *J Gen Virol* 83:2635-2662. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-11-2635>.
- Nogales A, DeDiego ML, Topham DJ, Martinez-Sobrido L** (2016) Rearrangement of influenza virus spliced segments for the development of live-attenuated vaccines. *J Virol* 90:6291-6302. <https://doi.org/10.1128/JVI.00410-16>.
- Palese P, Zheng H, Engelhardt OG, Pleschka S, Garcia-Sastre A** (1996) Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11354-11358. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11354>.
- Pattnaik AK, Wertz GW** (1990) Replication and amplification of defective interfering particle RNAs of vesicular stomatitis virus in cells expressing viral protein from vectors containing cloned cDNAs. *J Virol* 64:2948-2957.
- Pegoraro G, Bavari S, Panchal RG** (2012) Shedding light on filovirus infection with high-content imaging. *Viruses* 4:1354-1371. <https://doi.org/10.3390/v4081354>.
- Pena L, Sutton T, Chockalingam A, Kumar S, Angel M, Shao H, Chen H, Li W, Perez DR** (2013) Influenza viruses with rearranged genomes as live-attenuated vaccines. *J Virol* 87:5118-5127. <https://dx.doi.org/10.1128/JVI.02490-12>.
- Perez DR, Garcia-Sastre A** (2013) H5N1, a wealth of knowledge to improve pandemic preparedness. *Virus Res* 178:1-2. <https://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.11.001>.
- Perez DR, Lim W, Seiler JP, Yi G, Peiris M, Shortridge KF, Webster RG** (2003) Role of quail in the interspecies transmission of H9 influenza A viruses: Molecular changes on HA that correspond to adaptation from ducks to chickens. *J Virol* 77:3148-3156. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.5.3148-3156.2003>.
- Poole E, He B, Lamb RA, Randall RE, Goodbourn S** (2002) The V proteins of simian virus 5 and other paramyxoviruses inhibit induction of interferon-beta. *Virology* 303:33-46. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1737>.
- Post LE, Roizman B** (1981). A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes: alpha gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* 25:227-232. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90247-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90247-6).
- Pushko P, Lukashevich IS, Weaver SC, Tretyakova I** (2016) DNA-launched live-attenuated vaccines for biodefense applications. *Expert Rev Vaccines* 15:1223-1234. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1175943>.

Pushko P, Pearce MB, Ahmad A, Tretyakova I, Smith G, Belser JA, Tumpey TM (2011) Influenza virus-like particle can accommodate multiple subtypes of hemagglutinin and protect from multiple influenza types and subtypes. *Vaccine* 29:5911–5918. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.068>

Racaniello VR, Baltimore D (1981) Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4887–4891. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.8.4887>.

Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, Kaelin K, Huber M, Dotsch C, Christiansen G, Billeter MA (1995) Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J* 14:5773–5784. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00266.x>.

Richt JA, Garcia-Sastre A (2009) Attenuated influenza virus vaccines with modified NS1 proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 333:177–195. https://doi.org/10.1007/978-3-540-92165-3_9.

Schaap-Nutt A, D'Angelo C, Scull MA, Amaro-Carambot E, Nishio M, Pickles JP, Collins PL, Murphy BR, Schmidt AC (2010) Human parainfluenza virus type 2V protein inhibits interferon production and signaling and is required for replication in non-human primates. *Virology* 397:285–298. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.018>.

Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK (1994) Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J* 13:4195–4203.

Schrauwen EJ, Herfst S, Leijten LM, van Run P, Bestebroer TM, Linster M, Bodewes R, Kreijtz JH, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA, Kuiken T, van Riel D (2012) The multibasic cleavage site in H5N1 virus is critical for systemic spread along the olfactory and hematogenous routes in ferrets. *J Virol* 86:3975–3984. <https://doi.org/10.1128/JVI.06828-11>.

Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Süs J, Lipkind M, Kida H, Webster RG (1996) Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis* 40:425–437. <http://dx.doi.org/10.2307/1592241>.

Shortle D, DiMaio D, Nathans D. Directed Mutagenesis (1981) *Annu Rev Genet* 15:265–294. Doi: 10.1146/annurev.ge.15.120181.001405.

Sola I, Alonso S, Zúñiga S, Balasch M, Plana-durán J, Enjuanes L (2003) Engineered the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity. *J Virol* 77: 4357–4369. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.7.4357-4369.2003>.

Steel J, Lowen AC, Pena L, Angel M, Solorzano A, Albrecht R, Perez DR, Garcia-Sastre A, Palese P (2009) Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J Virol* 83:1742–1753. <https://doi.org/10.1128/JVI.01920-08>.

Stobart CC, Moore ML (2014) RNA virus reverse genetics and vaccine design. *Viruses* 6:2531–2550. <https://doi.org/10.3390/v6072531>.

Storey D, Dimock K, Kang CY (1984). Structural characterization of virion proteins and genomic RNA of human parainfluenza virus 3. *J Virol* 52:761–766.

Suguitan AL, Matsuoka Y, Lau YF, Santos CP, Vogel L, Cheng LI, Orandle M, Subbarao K (2012) The multibasic cleavage site of the hemagglutinin of highly pathogenic A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) avian influenza virus acts as a virulence factor in a host-specific manner in mammals. *J Virol* 86:2706–2714. <https://doi.org/10.1128/JVI.05546-11>.

Tan FL, Yin JQ (2004) RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection. *Cell Res* 14:460–466. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290248>.

Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C (1978) QB DNA-containing hybrid plasmids giving rise to QB phage formation in the bacterial host. *Nature* 274:223–228. <http://dx.doi.org/10.1038/274223a0>.

Temizkan G. *Moleküler Genetik* (2013) Nobel, İstanbul.

Treanor JJ, Schiff GM, Hayden FG, Brady RC, Hay CM, Meyer AL, Holden-Wiltse J, Liang H, Gilbert A, Cox M (2007) Safety and immunogenicity of a baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine: A randomized controlled trial. *JAMA* 297:1577–1582. <https://doi.org/10.1001/jama.297.14.1577>.

Watt A, Moukambi F, Banadyga L, Banadyga L, Groseth A, Callison J, Herwig A, Ebihara H, Feldmann H, Hoenen T (2014) A novel lifecycle modeling system for Ebola virus shows a genome length-dependent role of VP24 on virus infectivity. *J Virol* 88:10511–10524. <https://doi.org/10.1128/JVI.01272-14>.

Wenigenrath J, Kolesnikova L, Hoenen T, Mittler E, Becker S (2010) Establishment and application of an infectious virus-like particle system for Marburg virus. *J Gen Virol* 91:1325–34. <https://doi.org/10.1099/vir.0.018226-0>.

Wertz GW, Perepelitsa VP, Ball LA (1998) Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3501–3506. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3501>.

Whelan SP, Barr JN, Wertz GW (2004) Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 283:61–119. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-06099-5_3.

Wickersham IR, Sullivan HA, Seung HS (2013) Axonal and subcellular labelling using modified rabies viral vectors. *Nat Commun* 4:2332. <https://doi.org/10.1038/ncomms3332>.

Wiley DC, Skehel JJ (1987) The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 56:365–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.002053>.

www.lonza.com. Erişim tarihi: 01.08.2019

Ye S, Evans JG, Stambas J (2014) Influenza reverse genetics: dissecting immunity and pathogenesis. *Expert Rev Mol Med* 16:e2. <https://doi.org/10.1017/erm.2014.4>.

Yoneda M, Guillaume V, Sato H, Fujita K, Georges-Courbot MC, Ikeda F, Omi M, Muto-Terao Y, Wild TF, Kai C (2010) The nonstructural proteins of Nipah virus play a key role in pathogenicity in experimentally infected animals. *Plos One* 5:e12709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012709>.

Zhang X, Kong W, Ashraf S, Roy C (2009) A one-plasmid system to generate influenza virus in cultured chicken cells for potential use in influenza vaccine. *J Virol* 83:9296–9303. <https://doi.org/10.1128/JVI.00781-09>.

Zhirnov OP, Ikizler MR, Wright PF (2002) Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J Virol* 76:8682–8689. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.17.8682-8689.2002>.



Metastatic Osteosarcoma in a Kangal Breed Dog

Emin Karakurt^{1*}, Enver Beytut¹, Başak Kurt², Hilmi Nuhoğlu¹, Serpil Dağ¹, Uğur Yıldız²

¹Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, Kars, Turkey

²Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, Kars, Turkey

*Corresponding Author's E-Mail: mehmeteminkarakurt@hotmail.com

Abstract

In our study, we aimed to evaluate findings of osteosarcoma detected in a Kangal breed dog for the histopathological and radiographic aspects. The material of the study consisted of a male, 8 years old Kangal breed dog with a weight of 50 kg. There was no information about the history of the patient who was brought to the Surgical Clinic of the Faculty of Veterinary Medicine of Kafkas University with complaints of swelling in the left anterior extremity, lameness and respiratory weakness. Clinical examination revealed that the general condition of the patient was poor and there was a hard and painful swelling at the carpal joint level. Euthanasia was performed due to old age, poor condition and suspicious prognosis. Then, systemic necropsy was performed. After routine tissue follow-up procedures, 5 µm thick sections were taken from paraffin blocks for Hematoxylin Eosin staining. Sections were examined under light microscope to determine the histopathologic changes. Based on radiographic and histopathologic findings of the tumors in the left anterior extremity and metastatic foci in the lung, osteosarcoma was diagnosed.

Received 21 June 2019

Received in revised form 21 July 2019

Accepted 4 August 2019

Key words:

Dog, histopathology, metastasis, osteosarcoma, radiography.

Cite this article: Karakurt E, Beyrut E, Kurt B, Nuhoğlu H, Dağ S, Yıldız U (2019) Metastatic Osteosarcoma in a Kangal Breed Dog. Turk Vet J, 1(2):101-105.

Kangal Irkı Bir Köpekte Metastatik Osteosarkom

Özet

Bu çalışmamızda, Kangal ırkı bir köpekte saptanan osteosarkom vakasının histopatolojik ve radyografik açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın materyalini 8 yaşında erkek 50 kg ağırlığında Kangal ırkı bir köpek oluşturdu. Sol ön ekstremitede şişlik, topallık ve solunum güçlüğü şikayetleri ile Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Kliniği'ne getirilen hastanın geçmişine ilişkin bilgi edinilemedi. Klinik muayenede hastanın genel durumunun bozuk olduğu, karpal eklem seviyesinde, sert ve ağrılı bir şişliğin bulunduğu belirlendi. Hastanın yaşlı olması, genel durum bozukluğu ve prognozun kuşkuğu görülmesi üzerine ötenazisi yapıldı. Takibinde sistemik nekropsisi gerçekleştirildi. Rutin doku takip işlemlerinin ardından hazırlanan parafin bloklardan, Hematoksilen Eozin boyaması için 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Histopatolojik değişikliklerin belirlenmesi amacıyla kesitler ışık mikroskopunda incelendi. Elde edilen radyografik ve histopatolojik bulgular ışığında sol ön ekstremitedeki tümoral kitle ve akciğerdeki metastatik odaklara osteosarkom tanısı konuldu.

Anahtar sözcükler: Histopatoloji, köpek, metastaz, osteosarkom, radyografi.

Introduction

Osteosarcoma, the most common primary bone tumor of the appendicular skeleton in dogs (85 %), originates from mesenchyme (McNeill et al. 2007; Cristo et al. 2017; Murphy et al. 2017). This tumor, which accounts for approximately 70 % in cats of primary bone tumors, is rare in other animals (Kutsal et al. 2003; Gebhard et al. 2016; Thompson & Dittmer 2017). Osteosarcoma is formed especially in long bones such as radius, humerus, tibia and femur and more common in the anterior limbs (Sarierler et al. 2003; Erer & Kıran 2009; Altuğ & Deveci 2016). In rare cases, osteosarcomas are

observed in the ribs and skull bones (Erer et al. 1998). Osteosarcomas are osteolytic, osteoblastic and mixed according to their radiographic appearance (Erer et al. 1998; Aydoğan & Metin 2013); microscopically can be classified as osteoblastic, chondroblastic, fibroblastic, telangiectatic, and giant cell types depending on their matrix appearance in domestic animals (Boerman et al. 2012; Farjanikish et al. 2018). These tumors are locally aggressive and rapidly spread (McNeill et al. 2007, Sennazli et al. 2013). Osteosarcomas, which are highly metastatic, have a high recurrence rate and long-term

survival rates of this tumor are low (Gebhard et al. 2016, Leonardo et al. 2018; Withers et al. 2019). Cases originating from long bones in dogs usually metastasize to organs such as the lung, regional lymph nodes, liver and kidney (Kutsal et al. 2003; Murphy et al. 2017). It has rarely been reported to metastasize to the central nervous system, especially to the brain tissue (Pazzi et al. 2013; Cristo et al. 2017). It breaks down normal bones and metastasizes to the lung at a rate of 75% as a result of disease progression (Baştan 2013), and it is thought that this rate will increase to 100 % if dogs are death (Milli & Hazıroğlu 1997). Pulmonary metastases are similar to the primary tumor foci (Erer et al. 1998). Risk factors of this tumor were determined as age, race, body weight and sterilization status. (Tez et al. 2019). Osteosarcoma is more common in large breed dogs such as Ireland Setter, St. Bernard, Great Dane, Boxer and German Shepherd (Cristo et al. 2017; Murphy et al. 2017; Thompson & Dittmer 2017). There are some literature data indicating that some dog breeds such as Greyhound and Rottweiler are more prone to osteosarcoma (McNeill et al. 2007; Cristo et al. 2017). Male dogs are more sensitive than female dogs (Thompson & Dittmer 2017). The age of occurrence of the tumor is between 1 and 15 years of age (average 7.5) (Kutsal et al. 2003; Erer & Kıran 2009). Although the etiology of osteosarcoma has not been fully established in dogs; it is thought that metal implants used in fracture treatment, ionizing radiation and chronic osteomyelitis play a major role in the development of the tumor (Sarierler et al. 2003). Age progression and sterilization in dogs are the most important factors that increase the risk of osteosarcoma (Baştan 2013, Tez et al. 2019). Pathologic fractures, painful swelling and lameness are observed clinically in osteosarcoma (Kutsal et al. 2003; Altuğ & Deveci 2016; Thompson & Dittmer 2017).

In our study, we aimed to evaluate a case of osteoblastic osteosarcoma with lung metastasis in a Kangal breed dog with histopathological and radiographic parameters.

Case Report

The material of the study consisted of a male, 8 years old Kangal breed dog with a weight of 50 kg. There was no information about the history of the patient who was brought to the Surgical Clinic of the Faculty of Veterinary Medicine of Kafkas University with complaints of swelling in the left anterior extremity, lameness and respiratory weakness. Clinical examination revealed that the general condition of the

patient was poor and there was a hard and painful swelling at the carpal joint level. Euthanasia was performed due to old age, poor condition and suspicious prognosis. Subsequently, systemic necropsy was performed. Some of the tissue samples taken from the animal were fixed in decalcified solution and another part was fixed in buffered formaldehyde solution. From the paraffin blocks prepared following routine tissue procedures, 5 µm-thick sections were obtained for Hematoxylin-Eosin staining. To determine the histopathological changes, the sections were examined by light microscope.

On the radiological examination, osteolysis including the carpal joint and distal condensation starting from 1/2 part of the radius were determined. We observed that degeneration, which started as diaphyseal osteophytic growths in the bone cortex, extended into the soft tissue by the destruction of the cortex in the metaphyseal and epiphyseal region. We noted that it continued as a lesion that forming severe periosteal reaction without borders. Due to the specific localization of the lesion, we suspected that the mass could be a bone tumor (Figure 1a). Thoracic radiography was performed to investigate the presence of metastasis. Peribronchiolar thickening and increased opacity were observed in the lungs. In addition suspicious radiopaque foci were detected in some areas (Figure 1b).

In the necropsy, hard body growths surrounded by connective tissue which 13*15*16 cm in size were observed at the level of the left carpal joint, including the distal parts of the radius and ulna (Figure 2a). The surface of this mass was yellowish white, and connective tissue and bone growth were observed in some places (Figure 2b). In addition, we detected a large number of solid nodular areas which in size ranging from 1 to 3 mm in the lung and we thought that they were metastatic foci (Figure 2c). Black areas were observed in the medial portion of the bronchiolar lymph node. Significant growth was detected in the right and left prescapular lymph nodes.

In the histopathological examination of the tumoral mass, we observed atypical osteoblasts with hyperchromatic nuclei, trabecular matrix formations, whorling structures formed by fibrosis and fibroblasts and osteoid areas (Figure 3a). Additionally large and small metastatic foci were detected in the lung tissue. Metastatic foci were similar to the primary tumoral mass (Figure 3b).

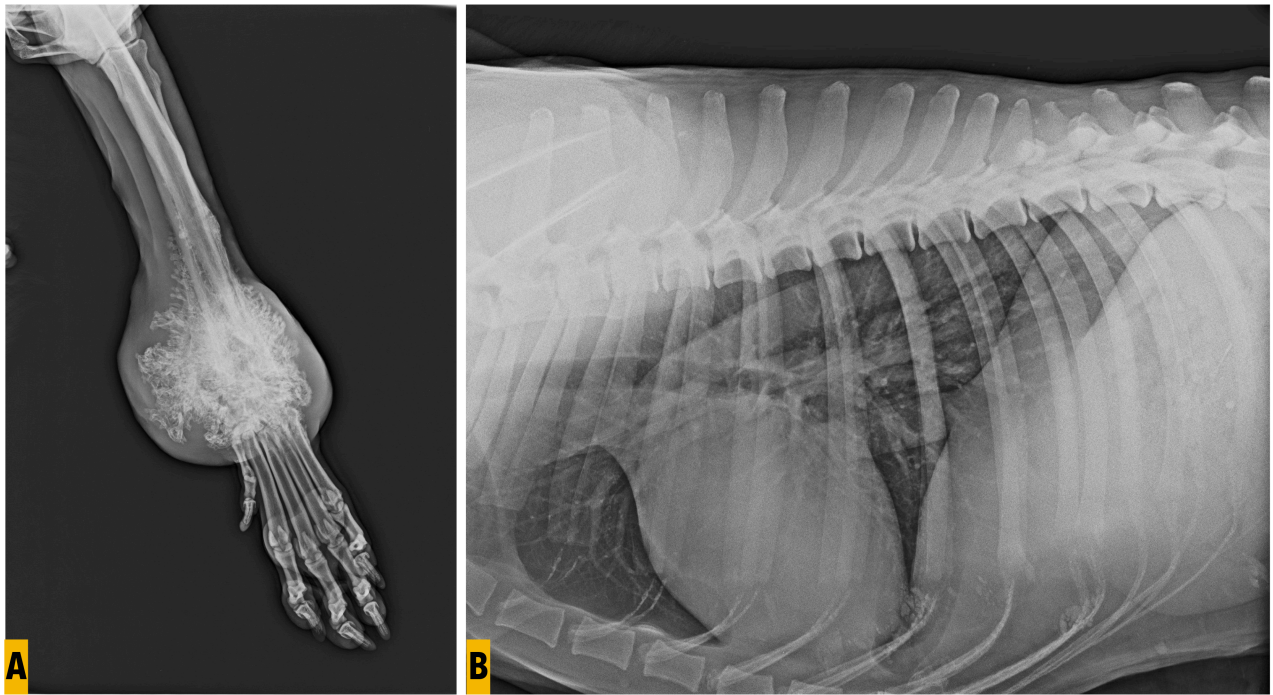


Figure 1. A) Radiographic appearance of the lesion in the left anterior limb, B) Thoracic radiography, suspicious radiopaque foci in the lung.



Figure 2. A) Swelling in the left anterior extremity, B) Macroscopic appearance of the tumor; The surface of this mass was yellowish white and connective tissue and bone growth were observed in some places, C) Lung metastasis; a large number of solid nodular areas with diameters ranging from 1 to 3 mm.

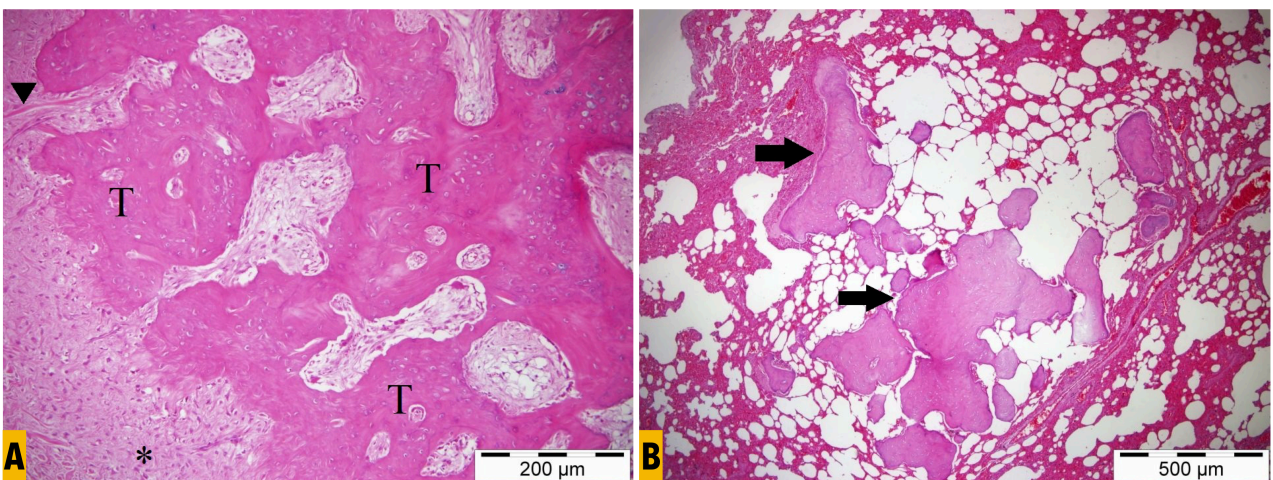


Figure 3. A) Trabecular matrix formations (T), whorling structures formed by fibrosis and fibroblasts (*), osteoid (arrowhead), H&E, Bar= 200 μ m, B) Metastatic areas (arrows) in lung, H&E, Bar= 500 μ m.

Discussion and Conclusion

Osteosarcomas are frequently observed in large breeds of dogs such as Ireland Sets, St. Bernard, Great Dane, Boxer, German Shepherd, Doberman, Pinscher, Golden Retriever, Rottweiler and Greyhounds (McNeill et al. 2007; Cristo et al. 2017; Murphy et al. 2017; Thompson & Dittmer 2017). This tumor is more common in male dogs than female dogs (Kutsal et al. 2003). The most common age range of this tumor from 1 to 15 years (Erer & Kıran 2009; Thompson & Dittmer 2017). In this study, similar to literature data (Kutsal et al. 2003; Güneş et al. 2009; Erer & Kıran 2009) osteosarcoma was observed in a male, 8 years old Kangal breed dog with a weight of 50 kg. Osteosarcomas are formed especially in metaphyseal region of the long bones such as distal radius, proximal humerus, proximal or distal tibia and distal femur and it is more common in the anterior limbs (Sarıerler et al. 2003; Hoenerhoff et al. 2004; Erer & Kıran 2009; Altuğ & Deveci 2016). The recurrence rate of osteosarcoma is quite high, the prognosis is very poor; and less than 20 % of the affected dogs do not live for more than 2 years (Wilson et al. 2008, Leonardo et al. 2018, Withers et al. 2019). Amputation and chemotherapy are the most commonly used treatment modalities (Farese et al. 2004). The rate of metastasis of osteosarcoma to the lung is 75% and it is thought that this rate will increase to 100 % if the dogs are death (Milli & Hazıroğlu 1997; Baştan 2013). Pulmonary metastases show a similarity to the primary tumor foci from which they originate (Erer & Kıran 2009). Osteosarcomas microscopically can be classified as osteoblastic, chondroblastic, fibroblastic, telangiectatic, and giant cell types depending on their matrix appearance in domestic animals (Boerman et al. 2012; Farjanikish et al. 2018). In our study, parallel to previous works (Kutsal et al. 2003; Erer & Kıran 2009; Altuğ & Deveci 2016), we detected the tumoral mass at the level of the left carpal joint, including the distal parts of the radius and ulna. In addition we observed metastatic areas in the lungs, which we believe were originated from the primary tumor focus of varying sizes, large and small solid consistency. In the histopathological examination of the tumoral mass atypical malign osteoblasts with hyperchromatic nuclei and matrix formed trabecular structures, swirl structures fibrocytes and fibroblast infiltrations and irregular osteoid islands were observed similar to literature data (Thompson & Dittmer 2017). Additionally large and small metastatic foci were detected in the lung tissue. Metastatic foci were similar to the primary tumoral mass.

In conclusion, we diagnosed osteoblastic osteosarcoma in the tumor mass taken from the left anterior extremity and metastatic areas of the lung based on the light of radiographic and histopathological findings. In the literature search, we observed that there are very few cases of osteosarcoma detected in Kangal breed dog (Erer et al. 1998) and we thought that the findings in our will contribute to the literature data in the context of native breeds.

References

- Altuğ** ME, Deveci MZY (2016) Dokularına Göre Tümöral Oluşumlara Cerrahi Yaklaşımlar. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Surg-Special Topics* 2:70-79.
- Aydoğan** A, Metin N (2013) Köpek Yumuşak Doku Tümörlerinde Patolojik Tanı: Derleme. *MAKÜ Sag Bil Enst Derg* 1:86-105.
- Baştan** İ (2013) Köpeklerde Sık Rastlanan Kanser Çeşitleri ve Önemli Klinik Özellikleri. *Dicle Üniv Vet Fak Derg* 1:25-29.
- Boerman** I, Selvarajah GT, Nielen M, Kirpensteijn J (2012) Prognostic factors in canine appendicular osteosarcoma - a meta-analysis. *BMC Vet Res* 8:56. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-56>
- Cristo** TG, Vargas CB, Bieuz G, Costa LS, Dal Pont TP, Kanamura CT, Salbego FZ, Traverso SD, Casagrande RA (2017) Metastatic osteosarcoma as a cause of hemorrhagic stroke in a dog. *Braz J Vet Pathol* 10:105-110. <https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v10i3p105-110>
- Erer** H, Elma E, Hatipoğlu H, Alkan F (1998) Kangal Irkı Bir Köpekte Osteosarkom Olgusu. *Vet Bil Derg* 14:107-112.
- Erer** H, Kıran MM (2009) *Veteriner Onkoloji*. 4.Basım, 110-114, Damla Ofset A.Ş., Konya
- Farese** JP, Ashton J, Milner R, Ambrose LL, Van Gilder J (2004) The effect of the bisphosphonate alendronate on viability of canine osteosarcoma cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 40: 113-117.
- Farjanikish** G, Dezfoulıan O, Mohammadi H (2018) Metastatic giant cell osteosarcoma in a cat. *Vet Res Forum* 9:289–292. <https://doi.org/10.30466/vrf.2018.32087>
- Gebhard** C, Fuchs-Baumgartinger A, Razzazi-Fazeli E, Miller I, Walter I (2016) Distribution and activity levels of matrix metalloproteinase 2 and 9 in canine and feline osteosarcoma. *Can J Vet Res* 80:66-73.

Güneş V, Atasever A, Atalan G, Onmaz AC (2009) Bir Köpekte Kuyruk Orijinli Metastazik Karsinosarkom Olgusu. F Ü Sağ Bil Vet Derg 23:111-115.

Hoenerhoff MJ, Kiupel M, Rosenstein D, Pool RR (2004) Multipotential Osteosarcoma with Various Mesenchymal Differentiations in a Young Dog. Vet Pathol 41:264-268.

Kutsal O, Kaya Ü, Vural S, Sağlam M (2003) Köpek ve Kedilerde 1986-2000 Yılları Arasında Ankara'da İncelenen Kemik Tümörleri. Turk J Vet Anim Sci 27:109-115.

Leonardo L, Laura P, Serena BM (2018) miR-1 and miR-133b expression in canine osteosarcoma. Res Vet Sci 117:133-137. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.12.002>

McNeill CJ, Overley B, Shofer FS, Kent MS, Clifford CA, Samluk M, Haney S, Van Winkle TJ, Sorenmo KU (2007) Characterization of the biological behaviour of appendicular osteosarcoma in Rottweilers and a comparison with other breeds: a review of 258 dogs. Vet Comp Oncol 5:90-98. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2006.00116.x>

Milli UH, Hazıroğlu R (1997) Veteriner Patoloji. s. 407-411. Tamer Matbaacılık, Ankara.

Murphy BG, Mok MY, York D, Rebhun R, Woolard KD, Hillman C, Dickinson P, Skorupski K (2017) Evaluation of P16 expression in canine appendicular osteosarcoma. BMC Veterinary Research 13:189. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1113-5>

Pazzi P, Tompkins S, Kirberger RM (2013) Canine spirocercosis-associated extraskelatal osteosarcoma with central nervous system metastasis. J S Afr Vet Assoc 84, E1-4. <https://doi.org/10.4102/jsava.v84i1.71>

Sarıerler M, Yürekli Y, Güzel N (2003) Clinical, Radiographical, and Histopathological Findings of A Dog with Osteosarcoma. Kafkas Univ Vet Fak Derg 9:203-206.

Sennazli G, Erdogan O, Devecioglu Y, Inal B (2013) A Case of Telangiectatic Osteosarcoma in a Dog. J Fac Vet Med Istanbul Univ 39:121-125.

Tez G, Kanca H, Alemdar H (2019) Köpeklerde kontrasepsiyon I: Cerrahi sterilizasyonun risk ve yararlarının değerlendirilmesi. Vet Hekim Der Derg 90:55-65. <https://doi.org/10.33188/vetheder.487204>

Thompson KG, Dittmer KE (2017) Tumors of Bone. In: Moulton JE (ed) Tumors of Domestic Animals, 5th edn. Wiley Blackwell, Iowa, pp 356-424

Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, Young KM, Friedrichs K, Argyle DJ (2008) Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. Vet J 175:69-75. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.07.025>

Withers SS, Skorupski KA, York D, Choi JW, Woolard KD, Laufer-Amorim R, Sparger EE, Rodriguez CO, McSorley SJ, Monjazeb AM, Murphy WJ, Canter RJ, Rebhun RB (2019) Association of macrophage and lymphocyte infiltration with outcome in canine osteosarcoma. Vet Comp Oncol 17:49-60. <https://doi.org/10.1111/vco.12444>



Surgical Correction of Unilateral Congenital Cryptophthalmos in a Lutino Cockatiel (*Nymphicus hollandicus*)

Aynur Demir*, Kübra Gerbaga Özsemir

Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul University-Cerrahpaşa, Istanbul, Turkey.

*Corresponding Author's E-Mail: aynurdemir_1903@hotmail.com

Abstract

A 3-year-old Lutino Cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) of unknown sex was referred to the clinics of our faculty for ocular examination due to lack of the upper and lower eyelids of the right eye since birth has been reported in this study. After anamnesis and detailed ocular examination (ocular ultrasound), congenital cryptophthalmos was diagnosed and the right palpebral fissure of the bird was corrected by a successful surgical procedure. This report provides the clinical features and surgical management of the variant of cryptophthalmos in birds.

Received 24 April 2019
Received in revised form 26 July 2019
Accepted 17 August 2019

Key words:

Atresia, congenital, cryptophthalmos, eyelid, Lutino Cockatiel

Cite this article: Demir K, Gerbaga Özsemir K (2019) Surgical Correction of Unilateral Congenital Cryptophthalmos in a Lutino Cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). Turk Vet J, 1(2):106-109.

Bir Sultan Papağanında (*Nymphicus hollandicus*) Tek Taraflı Kongenital Cryptophthalmosun Cerrahi Düzeltilmesi Olgusu

Özet

Bu çalışmada, fakültemiz kliniklerine doğduğundan beri sağ alt ve üst göz kapaklarının olmadığı şikâyeti ile göz muayenesi için sevk edilen, cinsiyeti bilinmeyen, 3 yaşlı, bir sultan papağanı rapor edilmiştir. Alınan anamnez ve yapılan ayrıntılı göz muayenesi (oküler ultrasonografi) sonrası kongenital kriptoftalmus tanısı konulmuş ve kuşun sağ göz palpebral fissürü başarılı bir cerrahi işlem ile düzeltilmiştir. Bu rapor kriptoftalmusun kuşlardaki görünümünün klinik özellikleri ve cerrahi tedavisi hakkında bilgi sağlamaktadır.

Anahtar sözcükler: Atrezia, göz kapağı, kongenital, kriptoftalmus, sultan papağanı

Introduction

Cryptophthalmos was first described by Zehender and Manz in 1872 (Buyukmihci ve ark., 1990, Cook, 2007). It is a rare anomaly characterized by an uninterrupted continuity of the skin covering the eyeball (Doneley, 2016, Gupta & Saxena, 1962). It is also known as eyelid atresia which can occur after trauma or inflammation and is more commonly seen in cockatiels (Mitchell & Tully, 2016). The eyelid aperture is either missing or too small (Buyukmihci ve ark., 1990). Sometimes only a few areas of cornea may be visible (Doneley, 2016). It can be congenital developmental anomaly or secondary to an injury such as self-trauma or infectious disease such as chlamydial infection, poxvirus conjunctivitis (Gupta & Sen, 1990, Gupta ve ark., 1990). This

condition is mostly bilateral, unilateral form being very rare (Buyukmihci ve ark., 1990).

It is classified into two types; complete and incomplete. The complete variety presents with the absence of the palpebral fissure, the eyelid skin completely covers the orbit. The incomplete variety presents with narrowing of the palpebral fissure. While complete eyelid atresia is the total fusion of the eyelid margins, incomplete one is the condition of a part of the eyelid margins (Cook, 2007).

In the previous studies, different abnormalities of eyelid have been reported. This condition is confused with other eyelid anomalies such as ankyloblepharon,

symblepharon, blepharophimosis (Buyukmihci ve ark., 1990, Cook, 2007, Rival, 2015).

The aim of this study was to show that surgical treatment that was previously reported to be unsuccessful may be an effective treatment procedure according to the results of this case.

Case Report

A 3-year-old Lutino Cockatiel was presented for ophthalmologic examination of persistent fusion of the upper and lower eyelids of the right eye since birth (Figure 1). On physical examination, the bird was bright and alert. It was in a good body condition, weighted 85 grams and had no other anomalies present. Both eyes were evaluated using direct ophthalmoscopy and ultrasonography. On ophthalmologic examination revealed the right eyelids had a too small palpebral fissure which was displaced medially from its normal location. The left eye was seen well, the right globe could not be evaluated because of the eyelid skin which is continuous over the globe and incomplete cryptophthalmos was diagnosed. But ultrasonographic examination revealed the right globe was in normal structure meaning that the globe size was normal in both eyes (Figure 2A-B). Diagnosis of congenital cryptophthalmos was made according to the anamnesis given by the owners and it was decided to be reconstructed with surgical technique of the right eyelid palpebral fissure. General anesthesia was induced by administration of isoflurane 2% concentration with modified glove mask. The bird was placed in dorsal recumbency, the head was turned laterally to expose the right eye and ocular surface was cleaned with a dilute solution of 0.05% betadine. Except the operation area,



Figure 1. 3-year-old, unknown sex Lutino Cockatiel with congenital cryptophthalmos. Bird had only a small opening on the right palpebral fissure.

the bird was covered with a sterile cloth. After the eyelid was cleaned with 0.9% sterile isotonic, the skin covering the right globe was incised by sharp dissection of full thickness to create the palpebral fissure. Ophthalmic microsurgical instruments were used to minimize surgical trauma. The surgical incision was performed from the medial palpebral fissure to the adhered lateral area using iris scissors and minimal bleeding was

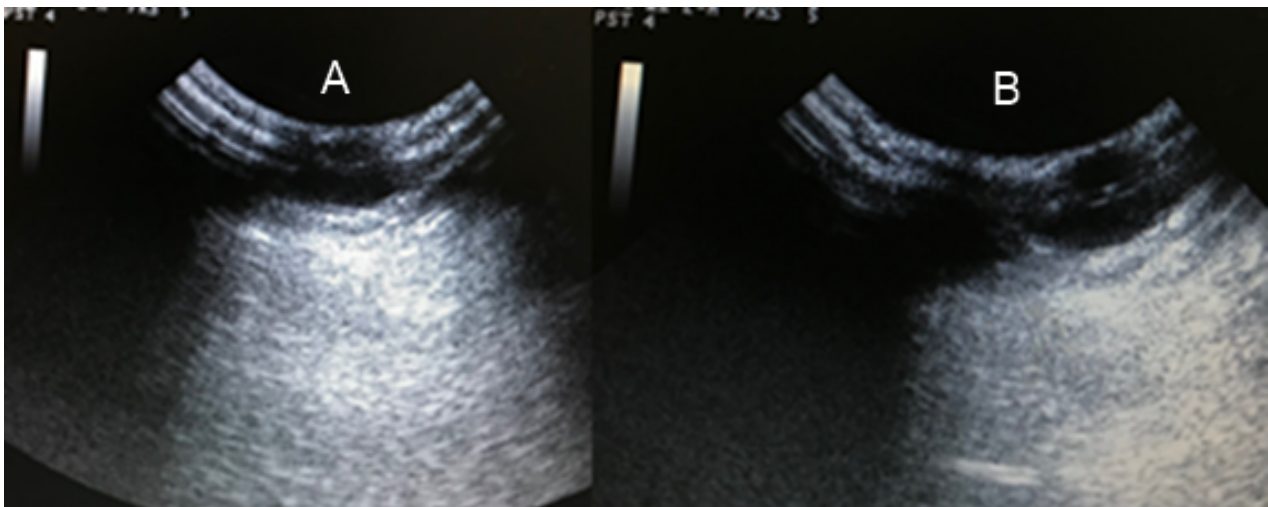


Figure 2. Ultrasonographic findings of left eye (A) and right eye (B). Both the left and right globes were evaluated in normal size and structure in ultrasonographic examination.

occurred with sterile swabs compression (Figure 3). Examination under anesthesia confirmed the preoperative ultrasonographic findings in the right eye which was normal size. No corneal or nictitans adhesions were observed. The right eye had normal pupillary and menace response. The eyelids mobility appeared to be normal after the incision. Suture was not applied to prevent the possibility of regional deterioration of the eyelid structure after the conjunctival mucosa adhered to the thin eyelid skin. Surgical correction was performed successfully. The bird regained a normal appearance Postoperatively, 0.3% tobramisin ve 0.1% dexamethasone (Tobradex®, Alcon laboratory, Turkey) eye drops (three times daily) and fusidic acid (Fucithalmic®, Abdi Ibrahim, Turkey) eye ointment (two times daily) were instilled for 2 weeks. Recheck was performed at first, second and fourth weeks. The palpebral fissure narrowed lightly 2 weeks after the surgery but never returned to its preoperative appearance (Figure 4,5).

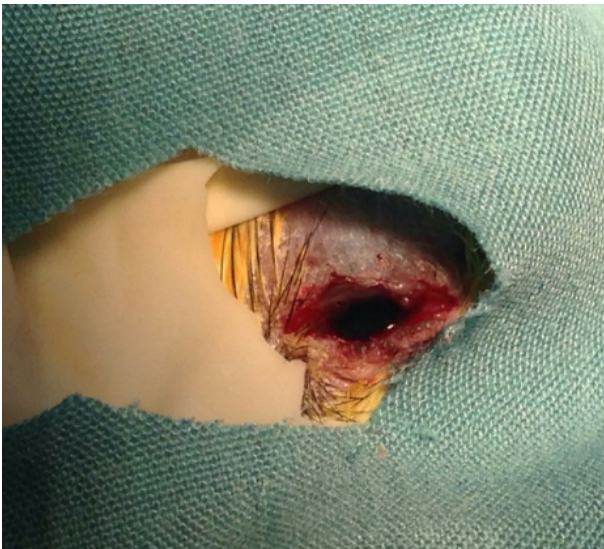


Figure 3. Apperance of eyelids after incision.



Figure 4. Apperance of the right eye 2 weeks after surgery. Palpebral fissure appeared to narrowed slightly.

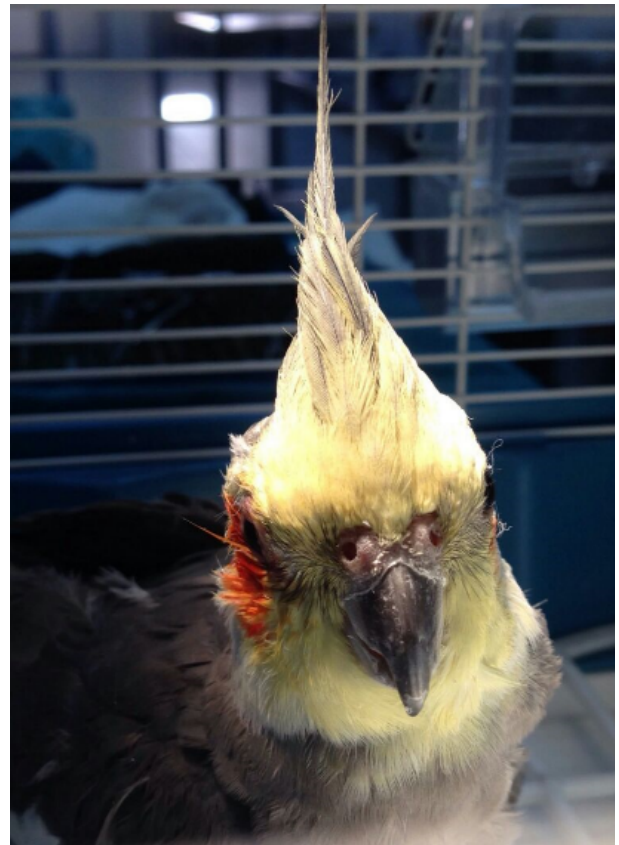


Figure 5: The frontal view of the bird in the fourth week.

Discussion

Anomalies of the eyelid in birds may occur due to congenital or secondary etiologies (Cook, 2007, Gupta & Saxena, 1962). In cockatiels, palpebral fissure lesions may develop owing to such causes as cryptophthalmos, ankyloblepharon, symblepharon and blepharophimosis (Cook, 2007, Rival, 2015). Although there are some similarities between them, cryptophthalmos is a congenital anomaly of the eye and there is no indication of a ciliary margin having formed, ankyloblepharon is usually secondary and there is a fusion of the upper and lower eyelids (Doneley, 2016, Rival, 2015, Subramanian ve ark., 2013). The term ‘symblepharon’ refers to multiple permanent adhesion between eyelid and globe due to the conjunctival inflammation (Pinard et al., 2006, Rival, 2015). The term ‘blepharophimosis’ refers to narrowing of palpebral fissure without eyelid fusion (Rival 2015).

Normally, in the neonatal periods such as a few weeks after birth for some species such as feline, canine and parrot, the eyelid margins usually remain fused (Doneley, 2016). In Cockatiel, complete separation is occurred within 10-12 days (Doneley, 2016, Gupta & Saxena, 1962). Rarely, eyelid margins may not be

completely separated during this process and this may result in palpebral congenital anomalies. These are one of the difficult problems encountered by surgeons. Cryptophthalmos from these animals has been reported in cockatiels by Buyukmihci et al. (1990). This is a very serious, congenital condition which has been reported in a dog and eyelids do not form, skin is continuous over the eye region (Gupta & Sen, 1990). In humans this condition is called by various authors, as cryptophthalmos syndrome or Fraser syndrome which is usually associated with multiple developmental defects such as nose and ear deformities, cleft palate, cleft lip, ankyloglossia, variations of the hairline, malformations of the teeth, hypertelorism, lacrimal duct defect, laryngeal atresia, renal anomaly, umbilical hernia, meningo-encephalocele, total or partial syndactyly, and incomplete development of the genitalia (Buyukmihci et al., 1990). However, at this reported case, lesion was not associated with other systemic anomalies and the exact etiologies of this condition was unknown. It is usually may present at birth as a result of abnormal embryogenesis. A study has been reported that the eyelid and palpebral fissure are induced by the contact of the optic vesicle with the surface ectoderm (Williams, 2012, Willis & Wilkie, 1999). If a problem develops in this contact, eyelid or palpebral fissure anomalies may occur. In this reported case, the bird was diagnosed to have congenital, unilateral cryptophthalmos due to the no history of illness or trauma (Williams 2012).

To our knowledge, this is the first reported case of a congenital cryptophthalmos with a successful surgical outcome in a Cockatiel although surgical procedures have been reported as unsuccessful according to previous reports in such clinical cases (Gupta & Sen, 1962, Rival, 2015). In previous studies, it has been reported that the skin covered the globes again and returned to the preoperative condition in about 1 month (Gupta & Saxena, 1962, Buyukmihci et al., 1990). But in this case we had a positive outcome from the surgical operation and the medical treatment which was administered postoperatively. Within two months, the skin did not return to its former state.

Kaynaklar

- Buyukmihci** NC, Murphy CJ, Paul-Murphy J, Hacker DV, Laratta LJ, Brooks DE (1990) Eyelid malformation in four cockatiels. *J Am Vet Med Assoc*, 196:1490-1492.
- Cook** CS (2007) Ocular Embryology and Congenital Malformations. In: Gelatt, KN (ed) *Veterinary Ophthalmology*, 4th edn. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp: 3-36
- Doneley** B (2016) Disorders of the eye. In: Doneley, B (ed) *Avian Medicine and Surgery in Practice: Companion and Aviary Birds*, 2nd edn. Apple Academic Press, Oakville, pp: 201-202
- Gupta** SP, Saxena RC (1962) Cryptophthalmos. *Br J Ophthalmol* 46: 629–632
- Gupta** VP, Sen RC (1990) Cryptophthalmos. *Br J Ophthalmol* 38: 97-99
- Mitchell** MA, Tully TN (2016) Special Senses: Eyes. In: Labella, A (ed) *Current Therapy in Exotic Pet Practice*, 1st edn. Elsevier Saunders, St Louis MO, pp: 446-447
- Pinard** CL, Fitzgerald G, Desmarchelier M (2006) Surgical repair of acquired ankyloblepharon in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). *J Avian Med Surg* 20: 253-257
- Rival** F (2015) Congenital ankyloblepharon in a leopard gecko (*Eublepharis macularius*). *Vet Ophthalmol* 18: 71-73.
- Subramanian** N, Iyer G, Srinivasan B (2013) Cryptophthalmos: Reconstructive Techniques Expanded Classification of Congenital Symblepharon Variant. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 29: 243-248.
- Williams** DL (2012) The avian eye. In: Williams, DL (ed) *Ophthalmology of Exotic Pets*. Wiley-Blackwell, pp: 134-135
- Willis** AM, Wilkie DA (1999) Avian ophthalmology, part 2: Review of ophthalmic diseases. *J Avian Med Surg* 13: 245-251



Turkish Veterinary Journal

Yazım Kuralları

Dergi hakkında

Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J), Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi tarafından yayımlanan, uluslararası, hakemli bilimsel bir dergidir. Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J), Türkçe veya İngilizce olarak, temel bilimler, klinik ve klinik öncesi bilimler, zootekni, hayvan besleme ile gıda hijyeni ve teknolojisi alanlarında makaleleri (araştırma makalesi, kısa bildiri, editöre mektup, derleme ve vaka takdimi türlerinde) yayımlar.

Dergiye, ulusal ya da uluslararası ilgi ve uygulama içiren ve yeni bilgiler barındıran makaleler sunulabilir. Yayımlanacak makalelerin, daha önceden yayımlanmamış ve araştırma sonuçlarına dayalı olması gerekmektedir (derleme makaleleri hariç). Yazarlar, yayında sundukları verilerin doğruluğunu kabul edip sorumluluğunu aldıklarının bilincinde olmalıdır.

Makale hazırlama

1. Sayfa ayarları

Sayfa kenar boşlukları her yonder 2,5 cm olarak ayarlanmalıdır. Yüklenilen word processor dosyasının doğal formatta olmasına dikkat edilmeli ve metin tek kolon halinde hazırlanmalıdır. Makale yayıma hazırlanırken çoğu formatlama kodları silinecek veya değiştirileceğinden metnin sayfa düzeni mümkün olduğunca basit tutulmalıdır. Makale hazırlanırken özellikle, kullanılan word programının otomatik kelime düzeltme fonksiyonu kapatılarak hazırlanmalı ve satır sonlarında kelimelerin tirelenerek bölünmesine izin verilmemelidir. Makalede koyu, üs, indis, italik vs. karakterler kullanılabilir. Tablolar hazırlanırken, her bir tablo için tek tip ve en az satır şekillendirmesi kullanılmalı ilave formatlardan kaçınılmalıdır. Tablonun kolonlarına metin yerleştirirken boşluk yerine tab tuşu kullanılarak yerleştirilmelidir. Makale içerisine gömülmüş olsun veya olmasın tablo, figür ve grafiklerin ayrı ayrı kaynak dosya olarak eklenmesi gerekmektedir. Makalenin giriş bölümünden başlayarak satır numaraları eklenmesi gerekmektedir.

2. Başlık sayfası

Başlık sayfasında makalenin adı, yazarların ad ve adresleri, kısa başlık (running head) ile sorumlu yazarın e-posta adresi verilmelidir.

Makalenin kısa ismi 60 karakterden (boşluklar hariç) uzun olmamalıdır. Makalenin uzun isminin yeterince kısa olduğu durumlarda uzun ve kısa isimler aynı olabilir.

Makalenin başlığı kısa fakat makalede sunulan çalışmaları tam anlamıyla yansıtan nitelikte olmalıdır. Genellikle başlıklar bilgi içermektense işaret edici olmalıdır. Makalenin sonucundan ziyade makalenin ana konusunu belirtmelidir.

Yazarların isimleri tam olarak verilmeli, yalnız baş harfleri verilmemelidir. Yazarların akademik dereceleri de kullanılmamalıdır. Makalede birden fazla kurumdan yazar bulunması halinde Arap rakamları ile yazar adının sonuna üs şeklinde numaralandırılarak yazarın kurumu belirtilmelidir. Adresler de aynı şekilde üssel olarak belirtilmelidir.

3. Özet

Dergiye sunulan tüm makalelerin özet bölümü olmalıdır. Sıklıkla yalnız özet çoğu platformda görünür olduğundan, özet referanslar verilmeden, kesin ve anlaşılır bir dille sunulmalıdır. Özet çalışmanın amacını, çalışılan türleri, gereç ve yöntemleri, yeni teori ve terminolojileri ve sonuç kısımlarını içerecek şekilde yazılmalıdır. Özete tablo, şekil, grafik, referans ve makalede yer almayan bir bilgi eklenmemelidir. Özette mümkün olduğu kadar kısaltmalardan kaçınılmamalıdır.

Özet hem Türkçe hem de İngilizce basılacaktır. Dolayısı ile başlık ve anahtar kelimeler de diğer dile çevrilmelidir. Özet 200 kelimeyi aşmamalıdır. En fazla 6 anahtar kelime özete eklenmelidir.

4. Giriş

Giriş bölümünde (makale başlığı eklenmeden, yeni sayfadan başlayarak) problemin tanımından başlayıp eski çalışmaların bulgularını ve sonuçlarını ifade ederek mevcut çalışmanın yapılış gayesi net bir biçimde vurgulanmalıdır.

5. Gereç ve Yöntemler

Yöntemler başka araştırmacılar tarafından tekrarlanacağından ya da sınınanacağından gereç ve yöntemler net bir biçimde tarif edilmelidir. Bilindik Yöntemler ya da testler Basitçe ismen ifade edilebilir ya da atıf yapılarak belirtilebilir. Kaynak belirtilerek ifade edilen kimyasal prosedürlerle ilgili olarak yöntemin temel prensipleri kısaca açıklanmalıdır.

6. Bulgular ve Tartışma

Bulgular ve tartışma istenirse ayrı başlıklar halinde ya da tek başlık altında da verilebilir. Giriş kısmında değinilerek yöntemlerde ifade edilen çalışmaların sonuçları bulgular kısmında net bir dille açıklanmalı ve tartışma kısmında ise bu bulgular yorumlanmalıdır. Bulgular Önceki çalışmalarla ilişkilendirilmeli, uyuşan ve uyuşmayan sonuçlar tartışılmalıdır. Çalışma sonuçlarının pratikteki önemi ve gelecekteki çalışmalara ön açma potansiyeli ifade edilmelidir. Deneylerin ve araştırmanın sonuçlarına dayanarak bilimsel yorumlar ve açıklamalar yapılmalıdır.

7. Sonuç

Sonuç kısmı bulgular ve tartışma ya da tartışma bölümünden ayrı bir bölüm olarak çalışmanın temel sonuçlarının ifade edildiği kısa bir bölüm olarak hazırlanmalıdır.

8. Kaynaklar

Yüksek geçerliliği olan kaynaklar kaynak gösterilmelidir. Kaynak olarak dergi makalesi, kitap, kitap bölümü, tez, ya da çevrimiçi kaynaklar kullanılabilir gibi yayımlanmamış bilgi de verilebilir. Bu durumda kişisel iletişim ya da yayımlanmamış bulgu ifadesi parantez içinde belirtilerek kaynaklar kısmında tekrardan bu bilgiye yer verilmez. Yazarlar, kaynakların tam ve doğruluğundan emin olmak zorundadır. Özet veya sonuç kısmında kaynak verilmemelidir.

Turkish Veterinary Journal, metin içerisinde yazar/ların soyadını takiben yayımlanma yılının olduğu isim-yıl sistemini (Harvard system) kullanmaktadır. Yazar sayısı 3 veya daha fazla olduğu durumlarda ilk yazarın soy adını takiben "ve ark.," ifadesi ve yıl verilmelidir. Altını çizme ya da italik yapılmamalıdır. Parantez içerisinde kaynağın kullanımı ile ilgili aşağıdaki örneklere göz atınız:

Cümle içerisinde yazarın adının yer alması durumunda:

Jones (2004), çocukların yeme alışkanlıkları hakkında detaylı bir çalışma yapmıştır.

Yazarın parantez içerisinde verilmesi durumunda:

Çalışmada (Jones, 2004) çocukların yeme alışkanlıkları araştırılmıştır.

Not: Eğer yazar/ların adını metin içerisinde vermiyorsanız cümle sonunda parantez içerisinde yazar soyadı, yıl olarak veriniz.

Yazar ve yılın cümle içerisinde verilmesi durumunda:

2004 yılında Jones, çocukların yeme alışkanlıkları hakkında detaylı bir çalışma yapmıştır.

Not: Yukarıdaki örnekte, yazar adı ve yılı metin içerisinde kullanıldığından ayrıca metin içerisinde parantezle atıf yapılmasına gerek yoktur.

İki yazar olması durumunda:

Calhoun ve Keller (1997) gelir temelli sıralamaların gelişmişliğin tek göstergesi olmadığını belirtmiştir. Gelir temelli sıralamalar önemli olmakla beraber gelişmişliğin tek göstergesi olmadığı belirtilmiştir (Calhoun & Keller, 1997).

Not: Atıf yapılan kaynağın yazarlarını metin içerisinde verirken "ve" parantez içerisinde verirken "&" kullanılmalıdır.

Üç ve daha fazla yazar olması durumunda:

Gelir temelli sıralamalar önemli olmakla beraber gelişmişliğin tek göstergesi olmadığı belirtilmiştir (Calhoun ve ark., 1997).

Dergi makalesi

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. Eur J Appl Physiol 105:731-738.

<https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Kitap

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

Kitapta bölüm

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Çevrimiçi belge

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Atıf yapılan yazar ve yılın aynı olduğu durumlarda hem metinde hemde kaynaklar kısmında yıldan sonra küçük harfle "...1997a ve/veya1997b" şeklinde belirtilmelidir.

Yayın ücreti:

Turkish Veterinary Journal makale yayımlama ücreti almamaktadır.

İnsan ve hayvan hakları belgeleri:

Çalışmalarda canlı insan ve/veya hayvan kullanılması durumunda yazarlar kullandıkları yöntemlerin ulusal ve/veya uluslararası ilgili mevzuatlara uygunluğunu belgelemek zorundadır. Çalışmada hayvan deneyleri yapılmışsa, makale gönderirken ilgili kurullardan aldıkları izin belgelerini mutlaka eklemeleri gerekmektedir.

Etik Kurallar

Bir yazarın adının makalede yer alması, rapor edilen araştırmayı, araştırmacının sonuçlarını ve sorumluluklarını kabul ettiği anlamına gelir. Sorumlu yazar, tüm yazarların makalenin yazımını sunulduğu haliyle kabul edip onayladığını ve yazarların makaledeki hangi işleri üstlendiklerini belgelemelidir.

Link1: Etik Kurallar

Link2: Çıkar Çatışması Belgesi

Link3: Telif Hakkı Devri Formu

İletişim:

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 58140, Sivas, TÜRKİYE

Telefon: +90 346 219 18 12

Belgegeçer: +90 346 219 18 12

E-posta: turkvetj@cumhuriyet.edu.tr

Web: <http://dergipark.gov.tr/turkvetj>



Turkish Veterinary Journal

Instructions for Authors

About the journal

The Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J) is an international peer-reviewed scientific journal published by Faculty of Veterinary Medicine, Sivas Cumhuriyet University, Turkey. The Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J) accepts manuscripts (research article, short communication, letter to editor, review article and case reports) in the field of basic sciences, preclinical, clinical, zootechnical, animal nutrition, food hygiene and technologies in English or Turkish languages.

Manuscript may be submitted in the fields of animal sciences if they contain new information of national or international interest and application. Sub-mission of a manuscript implies that it is based on research not previously published. All authors must be aware of and agree to the data presented and conclusions drawn in a manuscript.

Manuscript preparation

1. Page settings

Page margins should be 2.5 cm from each edge of the file. It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. Consecutive line numbering should be included starting from the section introduction of the manuscript.

2. Title page

Title page should include the title of manuscript, name(s) of the author(s) and their addresses, a short title (running head) and the e-mail address of the corresponding author should be supplied.

The short title should not exceed 60 characters (excluding word spaces). A short title should therefore be an abbreviation of the paper title that will give a brief but accurate description of the main topic of the paper. The main title of the paper may be used in full as the short title if it is not too long.

The title of the paper should be brief but should reflect all aspects of the work published. Generally, titles should be indicative rather than informative, i.e., they should state the subject of the paper rather than its conclusions but should identify the main topics of the paper.

Full given name(s) of author(s) should be used. Do not use initials and, don't include academic degrees or professional titles. When a paper has several authors from different institutions, key the author to the address with superscript Arabic numerals. (The numeral should follow the author's name and precede the address.)

3. Abstract

An abstract must be included with every paper submitted to the journals. The abstract should express precisely the most important information in the paper and should be intelligible in itself without reference to the paper, since abstracts are often published separately by abstracting journals. Include in the abstract the rationale for the study, the objectives, materials and techniques used, the names of relevant organisms, new theories and terminology and a conclusion. Do not include tables, figures or references or any information not carried in the text of the paper. Avoid acronyms, if possible.

The abstract is published in both English and Turkish. The translation of the abstract also carries a translation of the title and key words. Abstracts of papers should not exceed 200 words. A maximum of six key words or short phrases should be included with the manuscript. These will appear below the abstracts of the paper.

4. Introduction

The introduction (no heading, starting from a new page) should state clearly the rationale for conducting the research stating the problem, justifying the research and the findings of earlier research and the objectives of the study.

5. Materials and Methods

Subjects, materials and methods used should be described so that the work may be evaluated or repeated by other researchers. Well-known procedures and tests should not be described in detail but simply named or cited as a reference. Chemical procedures that are referenced should include a brief statement of the basic principles of the method.

6. Results and Discussion

Results and discussion may be presented as separate sections or combined under one heading. The Discussion section should interpret the data presented in the Results section with regard to the reason for the research presented in the introduction. Relate findings to previous research. Discuss agreement or conflict with previous work. State the conclusions of the research presented and present practical applications and avenues of future study. Scientific speculation should be identified as such; it should be reasonable, firmly founded in observations related in the manuscript and subject to experimentation.

7. Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

8. References

Cite only references that are highly pertinent. Reference may be made to journal papers, books, theses, dissertations, proceedings, bulletins, reports and published abstracts as well as to unpublished documents held in a library or archive to which the public has access. Unpublished material not accessible to the public such as letters, memos, etc., should be included in the text, followed parenthetically by the statement, "personal communication" or "unpublished observation", but should not be included in the reference list. Authors are responsible for ensuring that references are complete and accurate. Do not cite references in the abstract or in the conclusion.

The Turkish Veterinary Journal use the name-and-year system (Harvard system) in which the author's(s') surname(s) followed by the year of publication is cited in the text. If there are three or more authors, use the first author's surname followed by et al., (do not underline or italicize) on all occurrences. The use of parentheses depends on the sentence structure, for example:

Author named in your sentence:

Jones (2004) performed a detailed study on children's eating habits.

Author cited in parentheses:

The study (Jones, 2004) examined children's eating habits.

Note: If you do not mention the author's name in your sentence, the author's name should be given in the parenthesis. Separate the author's name and the year of the study with a comma.

Author and year listed in the sentence:

In 2004, Jones performed a detailed study on children's eating habits.

Note: No in-text citation is needed here because the author and the year of the study are listed in the sentence.

Source with two authors:

As Calhoun and Keller (1997) point out, "Income -based rankings are not the only measure of development".

Although income-based rankings are important, the "are not the only measure of development" (Calhoun & Keller, 1997).

Note: When you include the authors' names in your sentence, use the word "and." If you use the names in the citations, use the ampersand (&).

Three to five authors:

Although income-based rankings are important, the "are not the only measure of development" (Calhoun et al., 1997).

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) *The politics of nature*. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

If the cited author(s) and year are identical for more than one reference insert lower case letters after the year in both text citation and reference list e.g.:

Publication Fee:

There is no charge for publication of any type of manuscript. The Turkish Veterinary Journal totally free of charge.

Statement of Human and Animal Rights:

All papers submitted to our Journal should declare agreement with the following 'statement of human or animal rights'. When reporting experiments on animals or human, authors must indicate that the institutional and national guidelines for human or the care and use of laboratory animals was followed.

Ethical Statements

Naming an author on a paper implies that the person named is aware of the research reported, agrees with and accepts responsibility for any results or conclusions reported. The corresponding author shall

ensure that all authors are aware of, agree with, and support publication of the manuscript. When submitting the manuscript, "Ethical Statements" and "Conflicts of Interest Statement" should be provided. Copyright Release Form will be asked, if a manuscript was evaluated and accepted for publication.

Link1: *Ethical Statements*

Link2: *Conflicts of Interest Statement*

Link3: *Copyright Release Form*

Contact:

Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, 58140, Sivas, TURKEY

Phone: +90 346 219 18 12

Fax: +90 346 219 18 12

E-mail: turkvetj@cumhuriyet.edu.tr

Web: <http://dergipark.gov.tr/turkvetj>



Turkish Veterinary Journal Etik Kurallar

Tüm yazarlar adına ifade ederim ki Turkish Veterinary Journal'a sunmuş olduğumuz makalemiz:

Title of the manuscript

“.....”

All authors:

“.....”

- 1) Tamamı ya da bir kısmı herhangi bir yerde yayımlanmamıştır;
- 2) Sunulan makale an itibarı ile başka bir dergide yayımlanmak üzere değerlendirilmemektedir;
- 3) Makalenin hazırlanmasında tam yazarlar aktif roller almışlar ve katkıda buldukları konularda sorumluluğu kabul etmişlerdir.

“**Ghost-writing**” kabul edilemez. Yukarıda belirtilen yazarlardan başka hiç kimse makalenin yazımı ve revizyonu aşamalarına iştirak etmemiştir. Yazarların dışında makaleye kısmi katkıları olanların isimleri teşekkür kısmında zikredilmiştir.

Makale yazımı ve/veya etik kurallarla ilgili sorularınızı makaleyi sunmadan evvel Editör masasına turkvetj@cumhuriyet.edu.tr adresinden ulaştırabilirsiniz.

* * * * *

Lütfen her yazarın **SOYADI'nı** uygun kısımlara yazınız.

Çalışma tasarımı ve ana fikir:

Verilerin elde edilmesi:

Verilerin analizi:

Makalenin hazırlanması:

Kritik revizyon:

Tarih:/...../20.....

Sorumlu yazarın imzası



Turkish Veterinary Journal Ethical Statement

I testify on behalf of all co-authors that our article submitted to Turkish Veterinary Journal:

Title of the manuscript

“.....”

All authors:

“.....”

- 1) this material has not been published in whole or in part elsewhere;
- 2) the manuscript is not currently being considered for publication in another journal;
- 3) all authors have been personally and actively involved in substantive work leading to the manuscript, and will hold themselves jointly and individually responsible for its content.

Ghost-writing is NOT acceptable. No one, other than the authors listed below, should have contributed substantially to the writing and revising of the manuscript. Contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in the acknowledgment.

If you have any question about this, contact that editorial office before submitting your manuscript at turkvetj@cumhuriyet.edu.tr

* * * * *

Please type each author's **LAST NAME** next to the appropriate category.

Study conception and design:

Acquisition of data:

Analysis and interpretation of data:

Drafting of manuscript:

Critical revision:

Date:/...../20.....

Corresponding author's signature



Turkish Veterinary Journal

Çıkar Çatışması Belgesi

Makalenin başlığı

“.....”

Aşağıda isimleri listelenen yazarların makalede sunulan veriler ve/veya makalenin konusu ile ilgili olarak herhangi bir organizasyon veya oluşum ile finansal (harç, eğitim ödemesi, konuşmacı bürolarına iştirak, üyelik, çalışmalık, danışmanlık, hisse senedi sahipliği veya diğer hissedarlık işleri, uzman danışmanlık işleri, patent-lisans işleri gibi) ya da finansal olmayan (kişisel ya da mesleki ilişki, bağılılıklar, inançlar veya diğer birliktelikler gibi) herhangi bir çıkar ilişkisi yoktur.

Yazarların adları:

Aşağıda isimleri listelenen yazarların makalede sunulan veriler ve/veya makalenin konusu ile ilgili olarak aşağıdaki organizasyon ve/veya oluşumlarla finansal ve/veya finansal olmayan çıkar ilişkileri vardır. Lütfen çıkar ilişkilerini ayrı bir sayfada belirterek belgeye ekleyiniz.

Yazarların adları:

Bu belge yukarıda belirtilen ifadelerin doğruluğunu kayıt altına almak için tüm yazarlar tarafından imzalanmıştır. (Yazar sayısı 10 kişinin Üzerinde olduğu durumlarda sayfanın fotokopileri kullanılabilir.):

Yazar Adı Soyadı (el yazısı ile)	İmza	Tarih



Turkish Veterinary Journal Conflicts of Interest Statement

Title of the manuscript

“.....”

The authors whose names are listed immediately below certify that they have NO affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest (such as honoraria; educational grants; participation in speakers' bureaus; membership, employment, consultancies, stock ownership, or other equity interest; and expert testimony or patent-licensing arrangements), or non-financial interest (such as personal or professional relationships, affiliations, knowledge or beliefs) in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

Author names:

The authors whose names are listed immediately below report the following details of affiliation or involvement in an organization or entity with a financial or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript. Please specify the nature of the conflict on a separate sheet of paper if the space below is inadequate.

Author names:

This statement is signed by all the authors to indicate agreement that the above information is true and correct (a photocopy of this form may be used if there are more than 10 authors):

Author's name (typed)	Author's signature	Date



Turkish Veterinary Journal

Telif Hakkı Devri Formu

Makalenin Adı:

“.....”

Yazar(lar)ın Adı Soyadı (makaledeki sırayla):

“.....”

Sorumlu yazarın adı, soyadı :
Adresi :
TC Kimlik No :
Telefon :
E-posta :
Cep telefonu :

Sorumlu yazar olarak tüm yazarlar adına:

- sunulan makalenin yazar(lar)ın orijinal çalışması olduğunu;
- tüm yazarların bu çalışmaya bireysel olarak katılmış olduklarını ve bu çalışma için her türlü sorumluluğu aldıklarını;
- sunulan makalenin tüm yazarlarından makaleyle ilgili tüm mali hakları Turkish Veterinary Journal'a devretme ve formda yer alan taahhütlerde bulunma hususunda yetki aldığını, bu nedenle doğmuş veya doğabilecek tüm uyuşmazlıklardan sorumlu olacağını;
- tüm yazarların sunulan makalenin son halini gördüklerini ve onayladıklarını;
- tüm yazarlarla ilgili e-mail ve posta adreslerinin Turkish Veterinary Journal Makale Gönderme ve Değerlendirme Sistemi'ne doğru girildiğini;
- makalenin başka bir yerde basılmadığını veya basılmak için sunulmadığını;
- makalede bulunan metnin, şekillerin ve dokümanların diğer şahıslara ait olan Telif Haklarını ihlal etmediğini;
- sunulan makale üzerindeki mali haklarını, özellikle işleme, çoğaltma, temsil, basım, yayım, dağıtım ve İnternet yoluyla iletim de dahil olmak üzere her türlü umuma iletim haklarını Turkish Veterinary Journal yetkili makamlarınca sınırsız olarak kullanılmak üzere Turkish Veterinary Journal'a devretmeyi kabul ve taahhüt ederim.

Buna rağmen yazar(lar)ın veya varsa yazar(lar)ın işverenin

- patent hakları;
- yazar(lar)ın gelecekte kitaplarında veya diğer çalışmalarında makalenin tümünü ücret ödemeksizin kullanma hakkı;
- makaleyi satmamak koşuluyla kendi amaçları için çoğaltma hakkı gibi fikri mülkiyet hakları saklıdır.

Bununla beraber yazar(lar) makaleyi çoğaltma, postayla veya elektronik yolla dağıtma hakkına sahiptir. Makalenin herhangi bir bölümünün başka bir yayında kullanılmasına Turkish Veterinary Journal'e atıfta bulunulması şartıyla izin verilir. Atıf yapılırken Dergi Adı, Makale Adı, Yazar(lar)ın Adı, Soyadı, Cilt No, Sayı No ve Yıl verilmelidir.

Sorumlu yazar olarak, telif hakkı ihlali nedeniyle üçüncü şahıslarca istenecek hak talebi veya açılacak davalarda 'Turkish Veterinary Journal ve Editörlerinin' hiçbir sorumluluğunun olmadığını, tüm sorumluluğun Sorumlu yazar olarak bana ait olduğunu taahhüt ederim. Ayrıca makalede hiçbir suç unsuru veya kanuna aykırı ifade bulunmadığını, araştırma yapılırken kanuna aykırı herhangi bir malzeme ve yöntem kullanmadığımı, çalışma ile ilgili tüm yasal izinleri aldığımı ve etik kurallara uygun hareket ettiğimi taahhüt ederim.

Sorumlu Yazarın Adı Soyadı:

İmza :



Turkish Veterinary Journal Copyright Release Form

Title of the manuscript

“.....”

Full names of all authors (in order to appear on manuscript):

“.....”

Corresponding author's name :
Address :
ID Number :
Telephone :
E-mail :
Mobile phone :

“Turkish authors must supply their ID card number; foreign authors must supply their passport number (or, if not available, driving license number, ID card number, etc.).”

On behalf of all authors, as the corresponding author of the manuscript, I warrant that

- a) the manuscript submitted is my/our own original work;
- b) all authors participated in the work in a substantive way and are prepared to take public responsibility for the work;
- c) I was authorised by all authors to transfer all royalties related with the manuscript and to enter into a binding contract with Turkish Veterinary Journal as detailed in this Copyright Release Form, and I will be responsible in the event of all disputes that have occurred and that may occur,
- d) all authors have seen and approved the manuscript as submitted;
- e) e-mail and street addresses of all authors have been entered into the Turkish Veterinary Journal Manuscript Submission and Evaluation System correctly,
- f) the manuscript has not been published and is not being submitted or considered for publication elsewhere;
- g) the text, illustrations, and any other materials included in the manuscript do not infringe upon any existing copyright or other rights of anyone.
- h) I transfer all financial rights, especially processing, reproduction, representation, printing, distribution, and online transmittal, to Turkish Veterinary Journal with no limitation whatsoever,

Notwithstanding the above, the Contributor(s) or, if applicable the Contributor's Employer, retain(s) all proprietary rights other than copyright, such as

- a) patent rights;
- b) to use, free of charge, all parts of this article for the author's future works in books, lectures, classroom teaching, or oral presentations;

c) the right to reproduce the article for their own purposes provided the copies are not offered for sale.

However, reproduction, posting, transmission or other distribution or use of the article or any material contained therein, in any medium as permitted hereunder, requires a citation to the Journal and appropriate credit to Turkish Veterinary Journal as publisher, suitable in form and content as follows: Title of article, author(s), journal title and volume/issue, year.

As the corresponding author, I also warrant that "Turkish Veterinary Journal and the Journal Editors" will not be held liable against all copyright claims of any third party or in lawsuits that may be filed in the future, and that I will be the only person who will be liable in such cases. I also warrant that the article contains no libellous or unlawful statements, I/we did not use any unlawful method or material during the research, I/we obtained all legal permissions pertaining to the research, and I/we adhered to ethical principles during the research.

Corresponding Author's Full Name :

Signature :