

E-ISSN: 2548 - 1150 / Volume 4(2) / August 2019



JOURNAL OF ADVANCES IN
VETBIO SCIENCE AND
TECHNIQUES



Year 2019

Volume 4

Issue 2

EDITORIAL ARCHIVE

Editors-in-Chiefs

Hikmet Ün, University of Aksaray (ASU)
İlker Camkerten, ASU

Managing Editors

Gaye Bulut, ASU
Duygu Budak, ASU

Associate Editors

Güzin Camkerten, ASU, Basic Sciences
Hidayet Metin Erdoğan, ASU, Clinical Sciences
Suat Dikel, University of Çukurova, Fisheries

Editorial Board Members

Hasan Erdoğan, **Statistics**, University of Adnan Menderes, Türkiye
Başak Özgermen, **Language**, ASU, Türkiye
Betami Yılmaz, University of Harran, Türkiye
Caner Öztürk, ASU, Türkiye
Deniz Aliç Ural, University of Adnan Menderes, Türkiye
Halil Selcukbiricik, University of Afyonkocatepe, Türkiye
Hesham A. El Enshasy, Universiti Teknologi Malaysia, Malaysia
Hilal Karagül, University of Ankara, Ankara, Türkiye
Ilia Tshacev, University of Stara zagora, Bulgaria
Katarzyna Żarczyńska, University of Warmia-Mazury, Poland
Kerem URAL, University of Adnan Menderes, Türkiye
Koycho Koev, University of Stara zagora, Bulgaria
Mehmet Avcı, University of Harran, Şanlıurfa, Türkiye
Mehmet Çabalar, University of Harran, Türkiye
Muhammed Katica, University of Srajevo, Bosnia&Herzegovina
Przemysław Sobiech, University of Warmia-Mazury, Poland
Tevhide Sel, University of Ankara, Türkiye
Zbigniew Adamiak, University of Warmia-Mazury, Poland

Layout, Page Design, Typesetting
Faruk Kahraman, Abdurrahman Lüleci, Fatih Usta
e-mail: ejavst@gmail.com
Web Page: <http://dergipark.gov.tr/vetbio>
Phone: 05536203468
Names are listed alphabetically

Journal of Advances in VetBio Science and Techniques is aimed to serve as scientific research journal.

VetBio is a **triannual** (April, August, and December), open access, and fully refereed **international** journal.

VetBio is to publish high-quality scientific research articles on animal-related fields including science branches such as veterinary medicine, fisheries, food science, biological sciences, and zoology. In addition, short communications and reports, case reports, letter to the editor and reviews are also accepted. Publishing languages are Turkish and English. The editorial policy of the journal is based on independent, unbiased, and **double-blind** peer-review. The VetBio **does not charge** submission, processing or publication fee.

VetBio has been indexed by Index Copernicus International (ICI) World of Journals, Google Scholar, Academic Research Index (**Research Bib**), Root Society for Indexing and Impact Factor Service (**Rootindexing**), Eurasian Scientific Journal Index (**ESJI**), Cosmos Impact Factor, Scientific Indexing Services (**SIS**), Directory of Open Access Scholarly Resources (**ROAD**), and **OpenAIRE** databases.

This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)



August 31, 2019 / Copyright© VetBio

CONTENTS

Research Articles

VetBio 2019, 4(2),

Pages

Relationship among some colostral immune parameters and hepcidin in neonatal calves

Neonatal buzağlarda kolostral bazı immün parametreler ile hepsidin ilişkisi

✉ Ekin Emre Erkılıç, Hidayet Metin Erdoğan

51 - 58

Tıbbi sülük (*Hirudo verbana*)’den izole edilen *Aeromonas* spp. suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve çoklu antibiyotik direnç (ÇAD) indeks sonuçları

Determination of antibiotic susceptibilities of *Aeromonas* spp. strains isolated from medicinal leech (*Hirudo verbana*) and multiple antibiotic resistance (MAR) index results

✉ Jale Korun, Aycan Ulutaş, Mehmet Gökoğlu

59 - 66

Case Report

Canine masticatory myositis in a Rottweiler breed dog

Rottweiler ırkı bir köpekte kanin mastikatör kas miyozitisi

✉ Bahadır Karan, Murat Karabağlı, Kürşat Özer

67 - 71

Relationship among some colostral immune parameters and hepcidin in neonatal calves

Neonatal buzağlarda kolostral bazı immun parametreler ile hepsidin ilişkisi

ABSTRACT

This study was designed to determine levels of hepcidin, IgG, Lactoferrin, IL-6 and iron in blood serum, colostrum, milk of healthy cows and healthy calves on different days of the neonatal period. The study included 20 pregnant cows and 20 calves born to them. Blood samples were taken from pregnant animals 15 days before the birth and immediately after the birth. Blood samples were also obtained from the calves at birth before colostrum intake and 1, 3, 7, 14 and 28 days after birth. Colostrum samples were collected from mothers immediately after birth (first milking after parturition) and milk samples were taken postpartum on days 1, 3 and 7. Concentrations of serum and colostral hepcidin, lactoferrin, IL-6 and iron were measured using commercial kits. Serum hepcidin levels of cows given birth were higher than that of pregnancy period ($P>0.05$). Hepcidin levels in colostrum were significantly higher ($P<0.05$) when compared with milk samples. Following the intake of colostrum, serum hepcidin level of calves of day 1 was similar to that of day 3 ($P>0.05$) and significantly higher than the values of day 7, 14 and 28 days of life in calves ($P<0.001$). Serum hepcidin levels had similar pattern of changes to those of IgG, Lf and IL-6 after colostrum intake in calves.

In conclusion, the results suggested that hepcidin might be an important parameter in terms of calf health, given that it had similar pattern of changes as the immune parameters studied.

Keywords: Hepcidin, immune parameters, neonatal calves

ÖZET

Sunulan çalışmada sağlıklı neonatal buzağların kan serumu ile sağlıklı ineklerin kan serum, kolostrum ve sütündeki hepsidin, IgG, Laktoferrin, IL-6 ve demir düzeyinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışma materyalini, 20 adet Simental ırkı gebe inek ile bu ineklerden doğan buzağlar oluşturdu. Ölçümler için gebe hayvanlardan doğumdan 15 gün önce ve doğumdan hemen sonra kan alınırken, doğan buzağlardan kolostrum almadan önce (0. saat) ve yaşamlarının 1, 3, 7, 14 ve 28. günlerinde kan alındı. Ayrıca doğumdan hemen sonra (doğum sonrası ilk sağım) annelerden kolostrum, doğumu takip eden 1, 3 ve 7. günlerde ise süt örnekleri alındı. Doğumdan hemen sonra serum hepsidin seviyesinin gebelere göre daha yüksek olduğu kaydedildi ($P>0,05$). Kolostrumdaki hepsidin seviyesi, süt örneklerine göre yüksek bulundu ($P<0,05$). Buzağların kolostrum alımını takip eden 1 ve 3. gün hepsidin seviyesinin benzerlik gösterdiği ($P>0,05$) 7, 14 ve 28. günlerde 1. gün seviyesine göre önemli düzeyde düşük olduğu tespit edildi ($P<0,001$). Kolostrumdaki hepsidin, IgG, Laktoferrin, demir ve IL-6 seviyelerinin süte geçiş dönemine göre yüksek seviyede bulunduğu, buzağlarda kolostrum absorpsiyonu sonrasında hepsidin, IgG, Lf ve IL-6 düzeyi ile benzer şekilde değişiklikler gösterdiği belirlendi.

Sonuç olarak; hepsidin belirlenen immun parametreler ile benzer değişiklikler göstermesi göz önüne alındığında buzağı sağlığı açısından önemli bir komponent olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Hepsidin, immun parametreler, neonatal buzağlar

How to cite this article

Erkılıç, E.E., Erdoğan, H.M. (2019) Relationship among Some Colostral Immune Parameters and Hepcidin in Neonatal Calves. *J Adv VetBio Sci Tech.* 4(2): 51-58. <https://doi.org/10.31797/vetbio.538251>

Research Article

Ekin Emre Erkılıç¹
Hidayet Metin Erdoğan²

¹ Kafkas University, Faculty of Veterinary medicine, Dept. of internal medicine, Kars Türkiye ORCID: 0000-0003-2461-5598

² Aksaray University, Faculty of Veterinary medicine, Dept. of internal medicine, Aksaray / Türkiye ORCID: 0000-0003-1261-4352

Correspondence

Dr. Ekin Emre Erkılıç
ekin_emre_24@hotmail.com

Article info

Submission: 11-03-2019

Accepted: 09-05-2019

Online published: 05-08-2019

published: 31-08-2019

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



e-ISSN: 2548-1150

website: <http://dergipark.gov.tr/vetbio>

doi prefix: [10.31797/vetbio](https://doi.org/10.31797/vetbio).

INTRODUCTION

Neonatal morbidity and mortality, arising from various reasons, cause significant economic losses (Erdoğan et al., 2009). The primary tool used to reduce and prevent such losses is colostrum and the passive immunity transferred by colostrum. Colostrum is composed of antimicrobial factors, nutrients, growth factors, and hormones (Pakkanen and Aalto, 1997; Godson et al., 2003; Godden, 2008). Calves are born agammaglobulinaemic (Dewell et al., 2006). Colostrum plays a significant role in the development of passive immunity through mainly immunoglobulins. Calves with serum IgG levels below 10 mg/L are diagnosed as passive transfer deficiency (Godson et al., 2003). On the other hand, studies have shown that, neonatal animals with sufficient IgG levels could be exposed to disease, animals with insufficient IgG levels may resistance to disease (Gilbert et al., 1988; Tyler et al., 1999), and this has been attributed to passive immunity components other than IgG, including growth factors, cytokines, acute-phase proteins, lactoferrin (Lf), and unidentified other factors (Barton et al., 2006; Orro et al., 2008; Gökçe et al. 2014).

Hepcidin is a low-molecular-weight antimicrobial peptide hormone. It is produced by the hepatocytes of the liver, in response to high iron (Fe) levels and inflammatory stimuli (Singh et al., 2011; Ganz and Nemeth, 2012). Furthermore, hepcidin has also been identified as a type II acute-phase protein (Singh et al., 2011). A significant relationship between hepcidin, inflammation, immunity and Fe metabolism has been reported. Hepcidin synthesis increases during infection and inflammation, through stimulation of interleukin-6 (IL-6) (Ganz and Nemeth, 2012). Hepcidin reduces the release of Fe from macrophages and duodenal enterocytes into

the plasma (Anderson et al., 2007). During the course of bacterial infections, Fe is retained in tissues and cells, which reduces plasma Fe levels. This defence system is composed of Fe-binding compounds such as transferrin, Lf and ovotransferrin (Ong et al., 2006), and hepcidin the main regulator of Fe metabolism (Ganz, 2003). Hepcidin interacts with ferroportin (FPN) enabling the intermembrane transport of Fe (Nemeth et al., 2004). Following the binding of hepcidin to FPN, the hepcidin-ferroportin complex is broken down in lysosomes and Fe is trapped inside cells (mainly inside hepatocytes, macrophages and enterocytes) (Vyoral and Petrak, 2005). Therefore, both Fe and hepcidin are of great significance for immunity (Singh et al., 2011).

This study was designed to determine hepcidin, IgG, Lf, IL-6 and Fe levels in blood serum, colostrum, milk of healthy cows and the healthy calves on different days of the neonatal period.

MATERIALS AND METHODS

Animal material

The study included 20 pregnant Simmental cows and calves born from these cows. All animals were subjected to same management and nutritional conditions throughout the study period. Following parturition, the calves were weighed and bottle-fed with colostrum. An amount of 6% of body weight was given within the first 2 h. It was ensured that the calves were bottle-fed with a total amount of colostrum equalling to 10% of their body weight, within the first 12 h after birth.

Ethical Approval

This research has been approved by Kafkas University Animal Experiments Local Ethics Committee (KAU-HADYEK/2014-002).

Collection of blood, colostrum and milk samples

Blood samples were collected from the cows 15 days prior to parturition and shortly after parturition, and from the calves before colostrum feeding (day 0) and on days 1, 3, 7, 14 and 28. Blood samples were taken from the jugular vein into vacuumed gel-coated tubes (BD Vacutainer®, BD, UK). The blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min and were stored at -20°C, until being analysed.

Colostrum and milk samples were collected into tubes on day 0 (first milking after parturition) and days 1, 3 and 7 of postpartum. The samples were centrifuged at 4000 rpm for 30 min, and the lipid portion was discarded. The supernatant was stored at -20°C until being analysed.

Hepcidin, IgG, Lf and Fe measurements

Serum, colostrum and milk IgG (Bethyl®, USA), Lf (Bethyl®, USA) and hepcidin (MyBioSource®, USA) were measured using commercial ELISA kits. Fe levels were determined using an automatic biochemistry device (MINDRAY BS120®, Mindray, PRC).

Statistical analysis

Data was analysed using statistical software package SPSS® (SPSS 20, USA). The comparison of two parameters was made using t test. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine changes in parameters over time. The results obtained were expressed as mean and standard error (X±SE). Values of P<0.05 and below were considered statistically significant.

RESULTS

Alterations in parameters in pregnant cows

It was determined that significant differences existed between the IgG and Lf levels

measured in cows before parturition (day -15) and on the day of parturition (day 0). Serum IgG levels were determined to decrease from 1793±64.59 mg/dL to 1345±60.29 mg/dL (P<0.001), while serum Lf levels increased from 191.9±25.85 ng/mL to 337.6±42.27 ng/mL (P<0.05). On the other hand, no statistically significant alteration was determined in serum hepcidin, Fe and IL-6 levels (Table 1).

Alterations in colostrum parameters

It was determined that the colostrum hepcidin, IgG, Lf, Fe and IL-6 levels significantly decreased during the conversion of colostrum into milk. The values were higher in colostrum when compared to the values in milk (Table 2).

Alterations of parameters in calves

Serum hepcidin levels in calves after the absorption of colostrum on days 1 and 3 were significantly higher than the levels measured 0 h. Similarly, serum IgG, Lf and IL-6 levels were significantly increased after colostrum absorption. Serum Fe levels on day 1 following the absorption of colostrum was not different from that of 0 h.

Table 1. Serum hepcidin, IgG, Lf, Fe and IL-6 levels of the pregnant cows

Tablo 1. Gebe ineklerin serum hepcidin, IgG, Lf, Fe ve IL-6 düzeyleri

Parameters	Day of Parturition		
	Day -15	***	P
Hepcidin ng/mL	42.96±5.54	50.52±5.24	NS
IgG mg/dL	1793±64.59	1345±60.29	**
Lf ng/mL	191.9±25.85	337.6±42.27	*
Fe µg/dL	113.35±4.59	180.56±69.54	NS
IL-6 pg/mL	13.216±1.69	15.19±2.21	NS

* P<0.05, ** P<0.001, ***Blood samples taken shortly after birth. NS: Not significant.

Table 2. Hepsidin, IgG, Lf, Fe and IL-6 levels in milk and colostrum**Tablo 2.** Kolostrum ve sütte hepsidin, IgG, Lf, Fe ve IL-6 seviyeleri

Parameters	Colostrum (Day 0)	Milk (Day 1)	Milk (Day 3)	Milk (Day 7)	P
Hepsidin ng/mL	84.06±2.24 ^a	74.42±3.55 ^b	75.43±2.07 ^b	75.25±2.36 ^b	*
IgG mg/dL	6282±397 ^a	4118±263 ^b	1733±79 ^c	136±11 ^d	**
Lf ng/mL	104967±15209 ^a	89488±17460 ^{ab}	60028±15076 ^b	52034±4693 ^b	*
Fe µg/dL	318±31 ^a	82±11 ^b	55±10 ^b	52±10 ^b	**
IL-6 pg/mL	11022±622 ^a	498±55 ^b	488±15 ^b	-	**

* P<0.05, ** P<0.001.

Table 3. Alterations observed in the serum hepsidin, IgG, Lf, Fe and IL-6 levels of the neonatal calves**Tablo 3.** Yenidoğan buzağların serum hepsidin, IgG, Lf, Fe ve IL-6 seviyelerinde gözlenen değişiklikler

Parameters	0 h	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Day 28	P
Hp ng/mL	58.17±3.24 ^{cd}	84.52±1.82 ^a	75.80±2.61 ^{ab}	67.15±2.88 ^{bc}	61.98±3.61 ^c	50.43±4.15 ^d	**
IgG mg/dL	47±6 ^a	1534±110 ^{de}	1592±121 ^e	1320±97 ^{cd}	1084±87 ^c	820±74 ^b	**
Lf ng/mL	184.93±24.68 ^a	451.60±35.36 ^b	352.68±22.13 ^c	246.74±18.56 ^a	235.81±21.35 ^a	234.57±17.90 ^a	**
Fe µg/dL	84.82±2.69 ^a	98.82±2.97 ^{ab}	63.19±5.59 ^d	104.88±3.95 ^{bc}	113.94±4.70 ^{bc}	116.67±4.96 ^c	**
IL-6 pg/mL	9.69±2.31 ^a	17.85±2.46 ^b	11.93±1.67 ^{ab}	-	-	-	*

* P<0.05, ** P<0.001.

DISCUSSION

This study was designed to determine hepsidin, IgG, Lf, IL-6 and Fe levels in blood serum, colostrum, milk of healthy cows and healthy calves on different days of the neonatal period.

Starting from early pregnancy, Fe is required for placental and foetal development, increasing the number of maternal erythrocytes, and compensating for blood losses that occur during parturition. In the body, Fe is regulated by hepsidin (Koenig et al., 2014). Studies carried out in obese pregnant women demonstrated that, while hepsidin levels were higher, the Fe levels in their cord blood were lower compared with lean controls. It was suggested that, the chronic inflammation and oxidative stress, which obese women suffer from, increase hepsidin levels, and thereby, impair the transfer of Fe to the foetus (Dao et al., 2013). Human research has shown that hepsidin levels measured at the beginning of gestation decrease as gestation advances (Finkenstedt et al., 2012; Van Santen et al., 2013). In the present study, it was determined that the

hepsidin levels measured on the day of parturition were higher than the levels measured 15 days prior to parturition (Table 1). The differences between human researches and our study might be caused by differences in sampling days and species of concern. In our study, hepsidin levels measured shortly after birth were higher than 15 days prior to parturition. This might have been due to the opening of the cervix, vagina and vulva, and leaving the uterus exposed to pathogens and thus inflammation (Sheldon and Dobson, 2004). An increase in hepsidin levels during this period lowered the levels of Fe, which is a main nutritional source for pathogenic microorganisms (Vyoral and Petrak, 2005), and thereby, activated a non-specific defence mechanism.

In the present study, it was ascertained that the serum IgG levels on the day of parturition had significantly decreased in comparison to the levels measured 15 days prior to parturition (Table 1). This decrease was found to be in agreement with findings reported in previous studies (Detilleux et al., 1995; Franklin et al., 2005; Herr et al., 2011) and

was attributed to colostrogenesis. Previous research suggests that the dry period, lactation period (Noaman et al., 2012; Noaman, 2014) and lactation number (Yokuş and Çakır, 2006) do not have any impact on serum Fe levels. In the present study, although the Fe and IL-6 levels on the day of parturition were found to have increased in comparison to the levels 15 days prior to parturition, these alterations were determined to be statistically insignificant (Table 1). The IL-6 levels determined in the present study were found to be similar to those reported by Ergönül and Konaş Askar (2009). The results of the present study demonstrated significant increases in the Lf levels on the day of parturition, in comparison to the levels measured 15 days prior to parturition (Table 1). These significant increases were attributed to the stress caused by parturition, and Lf levels were considered to have increased due to the buffering function of this major antioxidant (Actor et al., 2009; Hidalgo et al., 2014). In addition, these increases are also thought to play a role in immunity to uterine infections due to restriction of Fe levels required to pathogens.

Previous reports shown that colostral IgG (Foley and Otterby, 1978; Blum and Hammon, 2000; Gomes et al., 2011), Lf (Sanchez et al., 1988; Blum and Hammon, 2000), Fe (Lönnerdal et al., 1981; Kume and Tanabe, 1993) and IL-6 (Hagiwara et al., 2000; Sobczuk-Szul et al., 2013) levels were high in colostrum and decrease with the conversion of colostrum into milk. Similar results have been obtained in the present study (Table 2). In the present study, colostral hepcidin levels were found to be significantly higher than the levels measured during the conversion of colostrum into milk (Table 2). We consider that this may be due to physiological changes in the composition of the colostrum.

Hepcidin levels in neonatal calves and alterations that occur in these levels with passive immunity have been investigated in

this study. Accordingly, it was determined that the serum hepcidin levels on day 1 after the absorption of colostrum were significantly higher than the levels measured before colostrum absorption. The serum hepcidin levels were also determined to display a progressive decrease similar to serum IgG and Lf levels (Table 3). The alterations observed in the hepcidin levels were attributed to passively absorption like other biologically active substances, such as immunoglobulins and Lf.

It has been determined that serum IgG levels significantly increase 24 h after the absorption of colostrum, and start to decrease as from day 1 in calves (Abel Francisco and Quigley, 1993; Rocha et al., 2012). Such alterations were also observed in the present study (Table 3). This decrease in serum IgG levels has been attributed to the decrease of the absorption of macromolecules as a result of changes in the intestines, the secretion of digestive enzymes by intestinal cells over time, and the decrease of colostral IgG levels with each milking (Gökçe and Erdoğan, 2013). IgG, which is the main component of passive immunity in calves, was determined to reach its peak level on day 3, in the present study. Furthermore, it was observed that the hepcidin levels have similar changes like IgG on these days.

Some researchers have reported that Fe levels increase on the first day, but later display a progressive decrease until the 4th week (Talukder et al., 2003). In another study, it was suggested that Fe levels decreased until the 4th day, but started to increase as from the 2nd week in calves (Klinkon and Ježek, 2012). In the present study, it was observed that the serum Fe levels had increased by the 24th h, in comparison to the day 0, but had significantly decreased by day 3, when compared to the first two samplings (Table 3). These findings were found to be in agreement with those reported by Klinkon and Jezek (2012). It has

been suggested that these decreases are due to the fact that hepcidin reduces the level of Fe required by microorganisms (Ganz, 2003; Singh et al., 2011). In the light of this data, it was considered that hepcidin played a role in the natural immunity of calves by showing a synergistic effect with IgG and Lf.

Holloway et al. (2002) suggested that no evidence existed between colostrum absorption and serum Lf levels. But Dawes et al. (2004) reported to have found Lf levels, before the absorption of colostrum, to be approximately 5 times lower than the levels measured at 24 h, in calves. Furthermore, these researchers determined a progressive decrease in Lf levels from the first day till the end of the neonatal period. In the present study, in calves, Lf levels reached their peak at 24 h, and progressively decreased until the end of the neonatal period. Similar changes were observed in serum IgG levels after from day 3 (Table 3). These data suggest that Lf play role in passive immunity.

Transfer of colostrum cytokines to neonates has been reported to contribute to the strengthening of newborn immune functions (Yamanaka et al., 2003) The high level of cytokines found in the composition of colostrum is reported to activate neonatal immunity (Hagiwara et al., 2000). In the present study, it was determined that the serum IL-6 levels before the absorption of colostrum showed a two-fold increase at 24 h, but decreased on the 3rd day to the level measured before the absorption of colostrum in calves (Table 3). In our study, it was determined that changes due to colostrum absorption in IL-6 in calves were similar to those of Yamanaka et al. 2003.

As a result, hepcidin levels of calves has similar changes with IgG, Lf and IL-6 after colostrum absorption. These findings suggest that hepcidin could have a role in passive immunity in calves.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research is summarized from doctoral thesis.

This research was supported by Kafkas University Scientific Research Projects Unit (2015-TS-17)

This research presented as an oral presentation in 11th Veterinary Internal Medicine Congress, 21-24 May 2015, Samsun, Turkey

REFERENCES

- Abel Francisco, S.F., Quigley, J.D. (1993). Serum immunoglobulin concentrations after feeding maternal colostrum or maternal colostrum plus colostrum supplement to dairy calves. *Am J Vet Res*, 54(7), 1051-1054.
- Actor, J.K., Hwang, S.A., Kruzel, M.L. (2009). Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr Pharm Des*, 15(17), 1956-1973.
- Anderson, G.J., Darshan, D., Wilkins, S.J., Frazer, D.M. (2007). Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals*, 20, 665-674.
- Barton, M.H., Hurley, D., Norton, N., Heusner, G., Costa, L., Jones, S., Byars, D., Watanabe, K. (2006). Serum lactoferrin and immunoglobulin G concentration in healthy or ill neonatal foals and healthy adult horses. *J Vet Intern Med*, 20, 1457-1462.
- Blum, J.W., Hammon, H. (2000). Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livest Prod Sci*, 66, 151-159.
- Dao, M.C., Sen, S., Iyer, C., Klebenov, D., Meydani, S.N. (2013). Obesity during pregnancy and fetal iron status: is Hecpidin the link? *J Perinatol*, 33(3), 177-181.
- Dawes, M.E., Latrikz, J., Tyler, J.W., Cockrell, M., Marsh, A.E., Estes, D.M., Larson, R.L., Stevens, B. (2004). Effects of supplemental lactoferrin on serum lactoferrin and IgG concentrations and neutrophil oxidative metabolism in Holstein calves. *J Vet Intern Med*, 18, 104-108.
- Detilleux, J.C., Kehrli, M.E., Stabel, J.R., Freeman, A.E., Kelley, D.H. (1995). Study of immunological dysfunction in periparturient holstein cattle selected for high and average milk production. *Vet Immunol Immunopathol*, 44, 251-267.
- Dewell, R.D., Hungerford, L.L., Keen, J.E., Laegreid, W.W., Griffin, D.D., Rupp, G.P., Grotelueschen, D.M. (2006). Association of neonatal serum immunoglobulin G1 concentration with health and performance in beef calves. *J Am Vet Med Assoc*, 228(6), 914-921.
- Erdoğan, H.M., Ünver, A., Cital, M., Güneş, V., Arslan, M.Ö., Tuzcu, M., Gökce, H.İ. (2009).

- Dairy farming in Kars district, Turkey: III. Neonatal calf health. *Turk J Vet Anim Sci*, 33(3), 185-192.
- Ergönül, S., Konaş Askar, T. (2009).** Anaplasmosisli sığırlarda ısı şok protein (HSP), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve interleukin (IL-6, IL-10) düzeylerinin araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15(4), 575-579.
- Finkenstedt, A., Widschwendter, A., Brasse-Lagnel, C.G., Theurl, I., Hubalek, M., Dieplinger, H., Tselepis, C., Ward, D.G., Vogel, W., Zoller, H. (2012).** Hepcidin is correlated to soluble hemojuvelin but not to increased GDF15 during pregnancy. *Blood Cells Mol Dis*, 48(4), 233-237.
- Foley, J.A., Otterby, D.E. (1978).** Availability, storage, treatment, composition and feeding value of surplus colostrum: A Review. *J Dairy Sci*, 61, 1033-1060.
- Franklin, S.T., Newman, M.C., Newman, K.E., Meek, K.I. (2005).** Immune parameter of dry cows fed mannan oligosaccharide and subsequent transfer of immunity to calves. *J Dairy Sci*, 88, 766-775.
- Ganz, T. (2003).** Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, 102(3), 783-788.
- Ganz, T., Nemeth, E. (2012).** Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, 1823, 1434-1443.
- Gilbert, R.P., Gaskins, C.T., Hillers, J.K., Parker, C.F., McGuire, T.C. (1988).** Genetic and environmental factors affecting immunoglobulin G1 concentrations in ewe colostrum and lamb serum. *J Anim Sci*, 66(4), 855-863.
- Godden, S. (2008).** Colostrum management for dairy calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 24(1), 19-39.
- Godson, D.L., Acres, S.D., Haines, D.M. (2003).** Failure of passive transfer and effective colostrum management in calves. *Large Anim Vet Rounds*, 3(10), 1-6.
- Gomes, V., Madureira, K.M., Soriano, S., Melville, A.M., Libera, P.D., Blagitz, M.G., Benesi, F.J. (2011).** Factors affecting immunoglobulin concentration in colostrum of healthy holstein cows immediately after delivery. *Pesq Vet Bras*, 31(Supl 1), 53-56.
- Gökçe, E., Erdoğan, H.M. (2013).** Neonatal buzağılarda kolostral immunoglobulinlerin pasif transferi. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, 4(1), 18-46.
- Gökçe, E., Atakisi, O., Kirmizigül, A.H., Ünver, A., Erdoğan, H.M. (2014).** Passive immunity in lambs: Serum lactoferrin concentrations as a predictor of IgG concentration and its relation to health status from birth to 12 weeks of life. *Small Ruminant Res*, 116, 219-228.
- Hagiwara, K., Kataoka, S., Yamanka, H., Kirisawa, R., Iwai, H. (2000).** Detection of cytokines in bovine colostrum. *Vet Immunol Immunopathol*, 76, 183-190.
- Herr, M., Bostedt, H., Failing, K. (2011).** IgG and IgM levels in dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology*, 75, 377-385.
- Hidalgo, M.A., Loncomán, C.A., Hidalgo, A.I., Andrade, V., Carretta, M.D., Burgos R.A. (2014).** Decreased cyclooxygenase-2 gene expression and lactoferrin release in blood neutrophils of heifers during the calving period. *Vet Immunol Immunopathol*, 160(1-2), 139-144.
- Holloway, N.M., Latrîkz, J., Tyler, J.W., Carlson, S.L. (2002).** Serum lactoferrin concentrations in colostrum-fed calves. *Am J Vet Res*, 63, 476-478.
- Klinkon, M., Ježek, J. (2012).** Values of Blood Variables in Calves. In: Perez-Marin CC (Ed), *A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine*. 1st ed. InTech, 301-320, Croatia. Ulaşım adresi: <http://www.intechopen.com/books/a-bird-s-eye-view-of-veterinary-medicine/values-of-blood-variables-in-calves>. Erişim Tarihi: 10.12.2014.
- Koenig, M.D., Tussing-Humphreys, L., Day, J., Cadwell, B., Nemeth, E. (2014).** Hepcidin and iron homeostasis during pregnancy. *Nutrients*, 6(8), 3062-3083.
- Kume, S.I., Tanabe, S. (1993).** Effect of parity on colostrum mineral concentrations of Holstein cows and value of colostrum as a mineral source for newborn calves. *J Dairy Sci*, 76(6), 1654-1660.
- Lönnerdal, B., Keen, C.L., Hurley, L.S. (1981).** Iron, copper, zinc, and manganese in milk. *Ann Rev Nutr*, 1, 149-174.
- Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., Kaplan, J. (2004).** Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306(5704), 2090-2093.
- Noaman, V., Rasti, M., Ranjbari, A.R., Shirvani, E. (2012).** Serum copper, zinc and iron status of various bovine categories on Holstein dairy cattle farms. *Comp Clin Pathol*, 21(6), 1727-1731.
- Noaman, V. (2014).** Serum copper, zinc and iron concentrations of Holstein dairy cows in different seasonal and physiological states. *Comp Clin Pathol*, 23, 1059-1062.
- Ong, S.T., Ho, J.Z.S., Ho, B., Ding, J.L. (2006).** Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology*, 211(4), 295-314.
- Orro, T., Jacobsen, S., Lepage, J.P., Niewold, T., Alasuutari, S., Soveri, T. (2008).** Temporal changes in serum concentration of acute phase proteins in newborn dairy calves. *Vet J*, 176(2), 182-187.
- Pakkanen, R., Aalto, J. (1997).** Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. *Int Dairy J*, 7(5), 285-297.

- Rocha, T.G., Nociti, R.P., Sampaio, A.A.M., Fagliari, J.J. (2012).** Passive immunity transfer and serum constituents of crossbred calves. *Pesq Vet Bras*, 32(6), 515-522.
- Sanchez, L., Aranda, P., Perez, M.D., Calvo, M. (1988).** Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 369, 1005-1008.
- Sheldon, I.M., Dobson, H. (2004).** Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 295-306.
- Singh, B., Arora, S., Agrawal, P., Gupta, S.K. (2011).** Hecpidin: a novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clin Chim Acta*, 412(11-12), 823-830.
- Sobczuk-Szul, M., Wielgosz-Groth, Z., Wronsky, M., Rzemieniewski, A. (2013).** Changes in the bioactive protein concentration in the bovine colostrum of Jersey and Polish Hostein-Friesian cows. *Turk J Vet Anim Sci*, 37, 43-49.
- Talukder, J.R., Takeuchi, T., Harada, E. (2003).** Receptor-mediated transport of lactoferrin into the cerebrospinal fluid via plasma in young calves. *J Vet Med Sci*, 65(9), 957-964.
- Tyler, J.W., Parish, S.M., Besser, T.E., Van Metre, D.C., Barrington, G.M., Middleton, J.R. (1999).** Detection of low serum immunoglobulin concentrations in clinically ill calves. *J Vet Intern Med*, 13(1), 40-43.
- Van Santen, S., Kroot, J.J.C., Zijderveld, G., Wiegerinck, E.T., Spaanderman, M.E.A., Swinkels, D.W. (2013).** The iron regulatory hormone hecpidin is decreased in pregnancy: a prospective longitudinal study. *Clin Chem Lab Med*, 51(7), 1395-1401.
- Vyoral, D., Petrak, J. (2005).** Hecpidin: A direct link between iron metabolism and immunity. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(9), 1768-1773.
- Yamanaka, H., Hagiwara, K., Kirisawa, R., Iwai, H. (2003).** Transient detection of proinflammatory cytokines in sera of colostrum-fed newborn calves. *J Vet Med Sci*, 65(7), 813-816.
- Yokuş, B., Çakır, U.D. (2006).** Seasonal and physiological variations in serum chemistry and mineral concentrations in cattle. *Biol Trace Elem Res*, 109(3), 255-266.

Tıbbi sülük (*Hirudo verbana*)’den izole edilen *Aeromonas* spp. suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve çoklu antibiyotik direnç (ÇAD) indeks sonuçları

Determination of antibiotic susceptibilities of *Aeromonas* spp. strains isolated from medicinal leech (*Hirudo verbana*) and multiple antibiotic resistance (MAR) index results

ÖZET

Bu çalışmanın amacı tıbbi sülük (*Hirudo verbana*)’den izole edilen hareketli *Aeromonas* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarını, Çoklu Antibiyotik Direnç (ÇAD) indekslerini ve plazmitlerin varlığını araştırmaktır. Suşların antibiyotik duyarlılıkları (ampisilin, kanamisin, kloramfenikol, nalidiksik asit, streptomisin, tetrasiklin, trimetoprim ve trimetoprim+sülfametoksazol) standart disk difüzyon tekniği ile belirlenmiştir. Plazmit izolasyonu manuel olarak tespit edilmiştir. Suşların Çoklu Antibiyotik Direnç (ÇAD) indeksleri hesaplanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, suşların en az bir antibiyotiğe karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen suşlar plazmit içermiştir.

Anahtar kelimeler: Tıbbi sülük, *Hirudo verbana*, *Aeromonas*, ÇAD, plazmit.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the antimicrobial susceptibility, Multiple Antibiotic Resistance (MAR) indices and the presence of plasmids of motile *Aeromonas* strains isolated from medicinal leech (*Hirudo verbana*). Antibiotic susceptibilities of the strains (ampicillin, kanamycin, chloramphenicol, nalidixic acid, streptomycin, tetracycline, trimethoprim and trimethoprim+sulphamethoxazole) were determined by standard disc diffusion technique. The plasmid isolation was determined by manually. The Multiple Antibiotic Resistance (MAR) index of the strains was calculated. According to the study results, it was determined that the strains were resistant against one antibiotic. The isoalted strains contained plasmids.

Keywords: Carp, Fiber Tank, Net Cage, Polyculture, Grass carp, Mirror carp.

GİRİŞ

Sülükler sucul ve karasal çevrelerde bulunan, karnivor ve segmentli kurtlar olup Annelida filumu, Clitellata sınıfında yer alırlar (Tripthi ve Ashalatha, 2015; Ayhan ve Mollahaliloğlu, 2018). Hirudinea alt sınıfında yer alan sülükler ise genel olarak deniz, tatlı su ve kara sülükleridir (Gödekmerdan vd., 2015). Sülüklerin bir kısmı kan emici olup bu grupta yer alan sülükler insan, evcil hayvanlar, balık, kurbağa, kaplumbağa ve yılan gibi çeşitli canlılar üzerinde dış parazit şeklinde yaşarlar (Gödekmerdan vd., 2015; Sağlam, 2018). Tipik olarak sülüğün vücudu dorsaventral şekilde yassılaştırılmıştır. Vücudunun ön ve arka kısımlarında yer alan segmentler farklılaşarak ön ve arka çekmen halini almıştır (Sig vd., 2017). Ön çekmen çok dişli üç çeneye sahipken, arka çekmen ise sülüğün yüzeye tutunmasına ve hareket etmesine yardımcı olur (Tripthi ve Ashalatha, 2015; Ayhan ve Mollahaliloğlu, 2018). Tıbbi sülüklerin kullanıldığı bir tedavi yöntemi olan hirudoterapi ilk kez Çinliler tarafından onuncu yy başlarında uygulanmıştır.

How to cite this article

Korun, J., Ulutaş, A. ve Gökoğlu, M. (2019) Tıbbi sülük (*Hirudo verbana*)’den izole edilen *Aeromonas* spp. suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve Çoklu Antibiyotik Direnç (ÇAD) indeks sonuçları. *J Adv VetBio Sci Tech*. 4(2): 59-66. <http://doi.org/10.31797/vetbio.534867>

Research Article

Jale Korun¹
Aycan Ulutaş²
Mehmet Gökoğlu³

Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri
Fakültesi Kampüs Arapsuyu – Antalya /
Türkiye

¹ ORCID: 0000-0002-1930-9978

² ORCID: 0000-0002-4892-6326

³ ORCID: 0000-0001-9723-8581

Correspondence

Prof. Dr. Jale Korun

jalekorun@akdeniz.edu.tr

Article info

Submission: 03-03-2019

Accepted: 12-05-2019

Online published: 08-08-2019

published: 31-08-2019

This work is licensed under a Creative
Commons Attribution 4.0 International
License



e-ISSN: 2548-1150

website: <http://dergipark.gov.tr/vetbio>

doi prefix: 10.31797/vetbio.

Hirudoterapi'nin popülaritesi 1884 yılında sülük salgısında bulunan ve antikoagülant özelliği olan hirudinin keşfi ile artmıştır (Gönenç, 2000). Bununla birlikte, hirudoterapi'nin enfeksiyon gibi çeşitli komplikasyonlara yol açabileceği de bildirilmiştir (Litwinowicz ve Blaszkowska, 2013). Başta *Aeromonas* spp. olmak üzere Gram-negatif bakteri türleri enfeksiyona neden olurken, tıbbi sülüklerin bağırsak florası üzerine yapılan çalışma sonuçlarına göre *A. hydrophila* ve *A. veronii* biovar *sobria* türlerinin sülüğün sindirim kanalındaki baskın türler olduğu ortaya koyulmuştur (Litwinowicz ve Blaszkowska, 2013; Verriere vd., 2016; Ruppé vd., 2018). *Aeromonas* türleri Aeromonadaceae familyasında yer alan *Aeromonas* cinsinin üyeleri olup bu türler fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyen, çomak şekilli Gram-negatif basillerdir. *Aeromonas* türleri psikrofilik ve mezofilik olmak üzere iki gruba ayrılır. Mezofilik türler insanlarda ve balık gibi soğuk kanlı canlılarda enfeksiyona neden olur (Elal Muş ve Çetinkaya, 2013; Furmanek Blaszk, 2014; Samal vd., 2014). Dünya genelinde ciddi bir sorun haline gelen bakteriyel enfeksiyonları tedavi edebilmek amacı ile çeşitli antibiyotikler geliştirilmiştir. Bununla birlikte, bakteriler zamanla antibiyotiklere karşı mutasyon ya da direnç belirleyicilerinin kazanılması sonucu dirençli hale gelmiştir (Kumar ve Varela, 2013). Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'ne göre, mikroorganizmaların orijinal olarak hassas oldukları bir ya da birden fazla antibiyotiğe karşı direnç gösterme, antibiyotik direnci şeklinde tanımlanmaktadır. Bakterilerde gelişen bu direnç başta insan sağlığı olmak üzere tarım ve endüstride ciddi sorunlara neden olabilmektedir (Zhou vd., 2015). Bir bakteri türünün antibiyotiğe duyarlı olması, önerilen dozlar ile yapılan enfeksiyon tedavisinde o bakteri türünün gelişmesini ve/veya üremesini önleyebileceğini gösterirken, dirençli olması ise antibiyotiğin normal dozlarda o bakteri türünün gelişmesini ve/veya üremesini önleyemeyeceği (Kusdarwati vd., 2017) anlamına gelmekle birlikte, antibiyotiğe karşı dirençli olma bakterinin bir özelliği olup direnç doğal veya kazanılmış direnç şeklinde iki gruba ayrılmaktadır (Öztürk, 2002; Ekici ve Yarsan, 2008). Birçok gram-negatif bakteri türü hücre duvarı yapıları sebebi ile

metisilin ve vankomisine doğal direnç gösterirken, enterokok türü bakteriler ise sefalosporinlere karşı doğal direnç gösterir (Öztürk 2002). *Aeromonas* türlerinin antibiyotiklere olan duyarlılıklarında belirgin farklar görülmekle birlikte dünya genelinde türlerin ampisilin, penisilin gibi beta laktamlara karşı dirençli oldukları kabul edilmekle birlikte, pek çok *Aeromonas* türünün kloramfenikol, tetrasiklin, trimetoprim-sülfametoksazol ve nalidiksik aside duyarlı olduğu bildirilmiştir (Awan vd., 2009; Joseph vd., 2013). Bu türlerin penisilinlere ve diğer antibiyotiklere direnci, türlerde plazmitlerin bulunuşu ile açıklanmıştır (Awan vd., 2009). Balık, balık dışı gıda örnekleri ve su dahil farklı kaynaklardan izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinin antimikrobiyal duyarlılıklarının yoğun olarak çalışılmasına (Altanlar vd., 2003; Awan vd., 2009) karşın tıbbi sülükten izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinin antimikrobiyal duyarlılıkları yoğun olarak çalışılmamıştır. Mevcut çalışmalar ise genellikle sülükten izole edilen türlerin hirudoterapi açısından insan sağlığına yönelik antimikrobiyaller üzerine dayandırılmıştır (Eroğlu vd. 2000; Whitaker vd., 2014; Verriere vd., 2016). Bu çalışmanın amacı bir su canlısı olan tıbbi sülük (*Hirudo verbana*)'den izole edilen *Aeromonas* spp. suşlarının kültür balıkçılığında kullanılagelen antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi, plazmit çalışması ve Çoklu Antibiyotik Direnç (ÇAD) indeks sonuçlarının değerlendirilmesidir.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada altı adet ve ortalama vücut ağırlığı 5.86 g olan sülük örnekleri ile çalışılmıştır. Bakteriyolojik çalışma öncesi sülükler anestezi madde olarak 2-fenoksi etanol kullanılarak anestezileri yapılmıştır. Anestezi sonrası sülüklerin vücut yüzeyleri %70'lik etanol ile silinmiş ve steril atılabilir öze kullanılarak vücut yüzeyinden örnek alınarak beyin kalp infüzyon buyyona (BHIB) ekimleri yapılmıştır. Sülüklerin karın kısımlarına sagittal kesim yöntemi uygulanarak bağırsak ortaya çıkartılmıştır. Bağırsaktan steril atılabilir öze ile örnekler alınarak BHIB'a ekimleri yapılmıştır. Sülüklerin ağız kısımlarından da aynı şekilde örnek alınarak BHIB'a ekimleri yapılmıştır. Ekimli besiyerleri 25 ± 2 °C de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda sıvı besiyerinden 1 µl alınarak Beyin Kalp İnfüzyon

Agar (BHIA)'lı besiyeri yüzeyine yayılmış ve ekimli tüm petri kutuları 25 ± 2 °C de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir (Eroğlu vd., 2000; Jaber vd., 2014). Bu süre sonunda besiyerleri incelendiğinde krem renkli, yuvarlak, konveks ve opak bakteri kolonilerinin geliştiği gözlenmiştir. İzole edilen suşlara hareket, Gram boyama, O/F fermentasyon, sitokrom oksidaz ve katalaz testleri ile O/129 vibriostat (10 µg ve 150 µg) uygulanmıştır. Suşların tanımlanmasında hızlı tanı ticari kit olan API20 E (BioMerieux, Fransa) kullanılmıştır. Bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılıkları standart disk difüzyon tekniği ile tespit edilmiştir. Kısaca, 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan 0.1 ml alınarak Mueller-Hinton Agar (MHA)'lı petrilerin yüzeyine yayılmış ve 10 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra besiyeri yüzeyine antibiyotik diskleri yerleştirilerek 24 ± 2 °C de 16-18 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon

süresi sonunda disklerin etrafındaki zon çapları ölçülerek değerlendirilmiştir (CLSI, 2006). Testler iki tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır. Çalışmada Ampisilin (AMP 10 µg), Kanamisin (K 30 µg), Kloramfenikol (C 30µg), Nalidiksik asit (NA 30µg), Streptomisin (S 10µg), Tetrasiklin (TE 30µg), Trimetoprim (W 5µg) ve Trimetoprim-Sülfametoksazol (SXT 25µg) ticari antibiyotik diskleri (Oxoid) kullanılmıştır. EUCAST (2018) de *Aeromonas* spp. için tüm antibiyotikleri kapsayabilmesi amacı ile Kalite Kontrol (KK) suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 suşunun antibiyotik duyarlılık çalışmalarına dahil edilmesi önerilmiştir. Bu nedenle, CLSI (2006) ve EUCAST (2018)'in önerileri dikkate alınarak, antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi çalışmalarına *E. coli* ATCC 25922 KK suşu da dahil edilmiştir. Tablo 1 de çalışmada kullanılan antibiyotikler ile KK suşu için tespit edilen zon çapı sınır değerleri verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan antibiyotikler ile *Escherichia coli* ATCC 25922 KK suşu için tespit edilen zon çapı sınır değerleri (mm).

Table 1. Zone diameters (mm) determined for *Escherichia coli* ATCC 25922 QC strain with antibiotics used in the study.

Antibiyotik	Disk içeriği (µg)	<i>E. coli</i> ATCC 25922*	<i>E.coli</i> ATCC 25922**
		İnhibisyon zon çapı (mm)	
		Aralık	Aralık
Ampisilin (AMP)	10	15-22	15-22
Kanamisin (K)	30	-	17-25
Kloramfenikol (C)	30	21-27	21-27
Nalidiksik asit (NA)	30	22-28	22-28
Streptomisin (S)	10	-	12-20
Tetrasiklin (TE)	30	-	18-25
Trimetoprim (W)	5	21-28	21-28
Trimetoprim-Sülfametoksazol (SXT)	25	23-29	23-29

E. coli ATCC 25922 için *EUCAST (2018) ve **CLSI (2017) referans alınmıştır.

Çalışmada suşların antibiyotik duyarlılıkları tespit edildikten sonra suşlar arasında direnci yüksek olan 5 suş plazmit çalışmalarında kullanılmıştır. Suşlardan plazmit DNA izolasyonu, kit kullanılmadan Tekdal (2009) ve Aşar vd. (2016)'a göre yapılmıştır. TSA da gelişme gösteren *Aeromonas* spp. kolonilerinden alınarak Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine ekimleri yapılmıştır. 37 °C de bir gece inkübasyon sonrasında kültürden 1.5 ml alınarak santrifüj tüplerine aktarılmış ve soğutmalı santrifüjde 10000 rpm de 1 dakika santrifüj yapılarak

çöktürülmüştür. Üsteki sıvı kısım (süpernatant) dökülerek bakteriyel pelet üzerine 100 µl soğuk çözelti I (25 mM Tris-HCL (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0) ve 50 mM glikoz) solüsyonu ile karıştırılıp çözündürülmüş ve üzerine 200 µl çözelti II (SDS eriyiği: %1 SDS ve 0.2 N NaCl) eklenerek buzda 15 dakika süre ile bekletilmiştir. Santrifüj sonrasında üsteki süpernatant alınarak temiz bir tüpe aktarılmış ve üzerine 1 hacim fenol:kloroform (1:1) eklenerek karıştırılmıştır. Karıştırma sonrası tüpler tekrar 10000 rpm de 5 dakika süre ile santrifüj edilerek üsteki süpernatant alınmış ve

üzerine iki hacim olacak şekilde saf etanol eklenerek buz üzerinde bekletilmiştir. Süre sonunda 10000 rpm de 10 dakika süre ile santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası üsteki süpernatant dökülerek pelet kısım %70'lik soğuk etanol ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası alkol uzaklaştırılarak kuruması beklenmiş ve üzerine 50 µl TE (10 mM Tris-EDTA (pH 8.0) solüsyonu eklenerek kullanılabilecek kadar -20 °C de muhafaza edilmiştir. Plazmit DNA'ları %0.7 agaroz jel elektroforez yöntemi ile analiz edilerek varlıkları ve sayıları tespit edilmiştir. Bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılıkları tespit edildikten sonra suşların Çoklu Antibiyotik Dirençlilik (ÇAD) indeksi de hesaplanmıştır. ÇAD indeksi test edilen suşların dirençli olduğu antibiyotik sayısı (a)'nın çalışmada denenen toplam antibiyotik sayısı (b)'na oranı ile bulunmuştur (Ehinmidu, 2003). Çalışmada ÇAD değerleri her bir suş için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

BULGULAR

Bakteriyolojik ekim çalışmalarında sülük örneklerinden 9 bakteri suşu izole edilmiştir. Suşların hepsi Gram-negatif, hareketli, fermentatif, sitokrom oksidaz ve katalaz pozitif olup suşların O/129 vibriostat (10 µg ve 150 µg) testlerine dirençli oldukları bulunmuştur. Suşlar Cipriano ve Austin (2011)'e göre *Aeromonas* spp. olarak tanımlanmıştır. Suşların API 20E hızlı tanı kiti sonuçları Awan vd. (2005)'in *Aeromonas caviae*

için bildirdikleri API 20E test sonuçları ile karşılaştırıldığında çalışmada izole edilen 9 suşun *A. caviae* ile uyumlu olduğu anlaşılarak, suşlar *A. caviae* suşları şeklinde tanımlanmıştır.

Çalışmada suşların antibiyotik duyarlılıkları standart disk difüzyon tekniği ile tespit edilerek suşların farklı antibiyotiklere olan duyarlılık ve/veya direnç durumlarının suşa bağlı olarak değiştiği anlaşılmıştır. Suşların hepsi ampisiline dirençli iken suşların streptomisine ise duyarlı oldukları bulunmuştur. Suşların kanamisin, kloramfenikol, nalidiksik asit, tetrasiklin, trimetoprim ile trimetoprim-sülfametoksazole duyarlılık durumları ise suşlar arasında farklılık göstermiştir. Çalışmada izole edilen dokuz suştan 2'sinin kanamisine duyarlı olduğu, 3 suşun dirençli ve 4 suşunda orta dirençli olduğu tespit edilmiştir. İki suşun nalidiksik aside dirençli olduğu 7 suşun ise duyarlılık gösterdiği bulunmuştur. İki suş tetrasikline dirençli iken, 2 suşun orta dirençli ve 5 suşun da duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Dokuz suştan 6'sı trimetoprime duyarlı iken, 3 suş dirençli olarak, 6 suşun trimetoprim-sülfametoksazole dirençli ve 3 suşun ise duyarlı olduğu bulunmuştur. Tablo 2 de suşların antibiyogram test sonuçları ve Tablo 3 de suşların antibiyotik duyarlılıklarının tespitinde karşılaştırma amaçlı kullanılan Kalite Kontrol suşu *E. coli* ATCC 25922'nin antibiyogram test sonuçları verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada izole edilen *A. caviae* suşlarının antibiyogram test sonuçları ve ÇAD indeks değerleri.
Table 2. The MAR index and antibiogram test results of *A. caviae* strains isolated in the study.

Antibiyotik	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
AMP	D	D	D	D	D	D	D	D	D
K	20(H)	15(D)	16(I)	15(D)	16(I)	16(I)	14(D)	16(I)	17(H)
C	D	30(H)	30(H)	15(D)	27(H)	27(H)	D	33(H)	31(H)
NA	15(D)	35(H)	30(H)	25(H)	32(H)	32(H)	16(D)	36(H)	30(H)
S	20(H)	12(H)	17(H)	18(H)	16(H)	15(H)	17(H)	13(H)	18(H)
TE	15(D)	18(H)	17(I)	30(H)	18(H)	15(D)	17(I)	18(H)	20(H)
W	D	28(H)	28(H)	D	28(H)	24(H)	15(D)	28(H)	30(H)
SXT	7(D)	27(H)	14(D)	D	28(H)	12(D)	8(D)	23(H)	15(D)
ÇAD	0.75	0.25	0.5	0.625	0.25	0.5	0.875	0.25	0.25

AMP: Ampisilin, K: Kanamisin, C: Kloramfenikol, NA: Nalidiksik asit, S: Streptomisin, TE: Tetrasiklin, W: Trimetoprim, SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, H: Duyarlı, D: Dirençli, I: Orta dirençli.

Tablo 3. *E. coli* ATCC 25922 (KK)'nin antibiyogram test sonuçları.
Table 3. Antibigram test results of *E. coli* ATCC 25922 (QC).

Antibiyotik	<i>E. coli</i> ATCC 25922 (KK)
AMP	16(H)
K	28(H)
C	25(H)
NA	30(H)
S	21(H)
TE	30(H)
W	34(H)
SXT	28(H)

AMP: Ampisilin, K: Kanamisin, C: Kloramfenikol, NA: Nalidiksik asit, S: Streptomisin, TE: Tetrasiklin, W: Trimetoprim, SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, H: Duyarlı.



Şekil 1. Suşların plazmit analiz sonuçları (M: Marker, Fisherscientific).

Figure 1. Plasmid analyses results of the strains (M: Marker, Fisherscientific).

Çalışmada beş suşun plazmit taşıdığı, 2 suş dışında diğer 3 suşun plazmit profilinin benzer olduğu ve diğer 2 suşun ise farklı plazmit profili gösterdiği ve plazmit büyüklüklerinin 24 kbp üzerinde olduğu anlaşılmıştır (Şekil 1).

Suşların duyarlı veya dirençli oldukları antibiyotikler tespit edildikten sonra suşların ÇAD indeks değerleri de hesaplanmıştır. Tablo 2 incelendiğinde suşların ÇAD indeks değerlerinin

suşa bağlı olarak değiştiği anlaşılmıştır. Suşların ÇAD indeks değerleri en düşük 0.25, en yüksek 0.875 olarak hesaplanmıştır.

TARTIŞMA

Mezofilik, hareketli *Aeromonas* türleri sucul çevrelerde doğal olarak bulunmakla birlikte, timsah, balık gibi soğuk kanlı hayvanlardan, et ürünleri, pastörize ve pastörize edilmemiş süt, klorlu ve klorsuz sulardan, içme ve kuyu

sularından, deniz, nehir ve tatlı su kaynaklarından, deniz ürünleri ile bağışıklık sistemi zayıflamış bireyler olmak üzere çeşitli kaynaklardan izole edilmiştir (Goñi-Urriza vd., 2000; Yücel vd., 2005; Odeyemi ve Ahmad, 2017). Bu çalışmada tıbbi sülük, *H. verbana*'dan hareketli *Aeromonas* suşları izole edilmiştir.

Hatha vd. (2005) farklı tatlı su balık türlerinden izole ettikleri *Aeromonas* türlerinin hepsinin ampisiline direnç gösterdiklerini, suşların %40'nın oksitetrasikline ve %10'unun ise nalidiksik aside dirençli olduğunu bildirmiştir. Çalışmada suşların hepsinin streptomisine duyarlı olduğu, kloramfenikole ise direncin düşük (< %20) olduğu tespit edilmiştir.

Jagoda vd. (2014) izole ettikleri 53 *Aeromonas* izolatının 8 antimikrobiyeye karşı duyarlılıklarını çalıştıkları çalışmalarında, suşların amoksisiline (beta-laktam antibiyotikleri) karşı dirençli olma durumlarının dışında tetrasiklin ile eritromisine en yüksek direnci gösterdiklerini, suşların %84.9'unun enrofloksasine, %81.1'inin kloramfenikole, %77.3'ünün neomisine ve %77.7'sinin sülfametoksazol-trimetoprim'e duyarlı olduğunu ve 53 izolattan 26'sında (%49) test edilen antibiyotiklere karşı çoklu direncin söz konusu olduğunu bildirmiştir.

Altanlar vd. (2003) çalışmalarında kuyu suyu örneklerinden izole ettikleri 66 hareketli *Aeromonas* suşunun hepsinin (%100) ampisiline ve eritromisine dirençli olduğunu, suşların siprofloksazin, sefalozin, sefaksim ve kuvvetlendirilmiş sülfonamidlere (trimetoprim+sülfametoksazol) duyarlı olduğunu bildirmiştir.

Odeyemi ve Ahmad (2017) 16'sı deniz hıyarı, 14'ü deniz suyu, 13'ü sediment ve 10'u bivalve olmak üzere çeşitli kaynaklardan 53 *Aeromonas* suşunu izole ve tanımlamıştır. İzolatlar arasında çoklu antibiyotik direnci bulunmuştur. 53 izolattan 53 (%100)'ünün ampisilin, novobiosin, sülfametoksazol ve trimetoprim'e dirençli olduğu, 53 suştan 24 (%45.3)'ünün nalidiksik aside, 49 (%92.5)'ünün penisiline, 25 (%47.2)'inin streptomisine dirençli olduğu tespit edilmiştir. Suşlar arasında en düşük direnç kanamisin ve gentamisin'e karşı gözlenmiştir. Bununla birlikte, izolatların hepsinin (53, %100) tetrasikline duyarlı

olduğu, suşlar arasında gentamisin ile oksitetrasikline duyarlılığın farklılık gösterdiği anlaşılmıştır. Bivalve ve deniz suyundan izole edilen 24 suşun hepsinin kanamisin, gentamisin, oksitetrasiklin ve tetrasikline, sedimentten izole edilen 13 *Aeromonas* izolatının ise kanamisin, gentamisin ve tetrasikline duyarlı olduğu bildirilmiştir. Deniz hıyarından izole edilen suşlar ise sadece tetrasikline duyarlılık göstermiştir. Çalışmada 53 *Aeromonas* suşunun ÇAD indeksi 0.25 ve 0.68 arasında değişmiştir.

Mevcut çalışmada sülükten izole edilen 9 *Aeromonas* suşunun beta-laktam antibiyotikleri arasında yer alan ampisiline direnç gösterdiği tespit edilmiş ve bu sonuç Altanlar vd. (2003), Hatha vd. (2005), Jagoda vd. (2014) ile Odeyemi ve Ahmad (2017)'nin sonuçları ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır. Çalışmada suşlar (%100) streptomisine duyarlılık göstermiştir. Hatha vd. (2005) çalışmalarında *Aeromonas* suşlarının (%100) streptomisine duyarlı olduğunu bildirerek, bu sonuç, bizim sonuçlarımız ile uyumluluk göstermiştir. Sülükten izole edilen suşların %77.7'si nalidiksik aside, %66.6'sı tetrasikline duyarlılık gösterirken, %66.6'sı ise trimetoprim+sülfametoksazole direnç göstermiştir. Hatha vd. (2005) çalışmalarında suşların %90'nın nalidiksik aside duyarlı, Odeyemi ve Ahmad (2017) deniz hıyarından izole edilen suşların (%100) tetrasikline duyarlı olduğunu bildirmiştir. Sülfam, trimetoprim, makrolidler ve florid kinolonlar gibi ilaçlar su kütlelerinde yaygın olarak bulunmakla birlikte, tetrasiklin ve siprofloksasin gibi hidrofobik antibiyotikler suda mevcut diğer partiküllere kolaylıkla tutunabilirler (Freitas vd., 2018). Mevcut çalışmada diğer araştırmacıların çalışmalarında olduğu gibi sülükten izole edilen suşların genel olarak direnç gösterdikleri ampisilin dışında, birden fazla antibiyotiğe değişen derecelerde direnç göstermelerinde Freitas vd. (2018)'in bildirdiği bazı antibiyotiklerin hidrofobik özellikleri etkili olabilir.

Antimikrobiyal direnç ve virülens faktörleri gibi bakteriyel fenotipik özellikler plazmit tarafından kodlanmaktadır. Bakteri suşlarında plazmitlerin bulunması klinik olarak önemli bakteri türlerinin virülens özelliklerini arttırmaktadır. Bu nedenle, bakterilerde

plazmitlerin bulunması potansiyel sağlık riskine yol açmaktadır (Abdulhamd, 2010). Freitas vd. (2018) çalışmalarında 77 izolattan 14'ünün plazmit içerdiğini ve bunlardan 8'inin kromozomal DNA'dan daha büyük mega plazmitleri içerdiğini bildirmiştir. Abdulhamd (2010) 10 hareketli *Aeromonas* suşundan plazmit izole ederek, suşların hepsinin plazmit içerdiğini ve bu plazmitlerin boyutlarının 1.5 kb ile 16.0 kb arasında değiştiğini bildirmiştir. Çalışmamızda sülüklerden izole ettiğimiz *Aeromonas* suşlarının plazmit analizlerinde suşların plazmit içerdiği ve Abdulhamd (2010) ile Freitas vd. (2018) çalışmalarındaki sonuçlara benzer şekilde plazmit boyutlarının büyük olduğu anlaşılmıştır.

Joseph vd. (2013) farklı kaynaklardan izole ettikleri *Aeromonas* suşlarında, suşların %20'sinin ÇAD indeks değerlerinin > 0.2 olduğunu bildirerek, bu değer yüksek çevre riskinin göstergesi olduğunu bildirmiştir. Odeyemi ve Ahmad (2017) *Aeromonas* suşlarında ÇAD indeksinin 0.25 ile 0.68 arasında değiştiğini bildirmiştir. Bu çalışmada 9 *Aeromonas* suşunun ÇAD indeks değerleri yukarıda belirtilen araştırmacılarınkine benzer şekilde yüksek bulunmuştur.

SONUÇ

Çalışmada tıbbi sülük (*Hirudo verbana*)'dan 9 hareketli *Aeromonas* suşu izole ve identifiye edilmiştir. Sülükten izole edilen bakteri türlerinin antibiyotik duyarlılığı, plazmit varlığı ve ÇAD (Çoklu Antibiyotik Direç) indeks değerlerinin incelendiği bu çalışmada suşların beta-laktam antibiyotiklere olan (ampisilin) direnç durumları dışında birden fazla antibiyotiğe dirençli olarak ve ÇAD indeks değerleri ise > 0.2 'den yüksek bulunmuştur. Suşlar ayrıca plazmit içermiştir. Tıbbi sülükler Hirudoterapide kullanılmakla birlikte, hareketli *Aeromonas* türleri sülüklerin sindirim kanalındaki baskın bakteri türleri arasında yer almaktadır. Çalışmada izole edilen *Aeromonas* suşlarının direnç durumları değerlendirildiğinde Freitas vd. (2018) tarafından bildirildiği gibi sülfam, trimetoprim, makrolidler ve florid kinolonlar gibi ilaçlar su kütlelerinde yaygın olarak bulunmakla birlikte, tetrasiklin ve siprofloksasin gibi hidrofobik antibiyotikler suda mevcut diğer partiküllere kolaylıkla tutunabilmeleri sonucu, bu

suşlarda direnç artışına neden olmuş olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdulhamd, A. (2010).** Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of motile aquatic aeromonads. *IJCEA*, 1(1), 90-96.
- Altanlar, N., Yücel, N., Akın, A. (2003).** Occurrence and antibiotic susceptibility of motile *Aeromonas* spp. of untreated well water. *J Fac Pharm, Ankara*. 32(3), 151-157.
- Avşar, C., Berber, İ., Yıldırım, A K. (2016).** Sinop ilindeki hamsi ve zargana balıklarından *Vibrio* spp. izolasyonu ve karakterizasyonu. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 73(2), 121-130.
- Awan, M. B., Maqbool, A., Bari, A., Krovacek, K. (2009).** Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *New Microbiol*, 32, 17-23.
- Ayhan, H., Mollahaliloğlu, S. (2018).** Medicinal leech therapy. *Ankara Med J*, 20(1), 141-148.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2006).** Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; approved guideline, CLSI document M42-A, 26(23), USA.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2017).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed., CLSI Supplement M100, USA.
- Ehinmidu, J.O. (2003).** Antibiotics susceptibility patterns of urine bacterial isolates in Zaria, Nigeria. *Trop J Pharm Res*, 2(2), 223-228.
- Ekici, H., Yarsan, E. (2008).** Antibiyotiklere direnç ve dirençliliğin boyutlarının çok yönlü değerlendirilmesi. *Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi*, 3-4, 85-93.
- Elal Muş, T., Çetinkaya, F. (2013).** Perakende su ürünlerinde *Aeromonas hydrophila* varlığının araştırılması. *Uludağ Univ J Fac Vet Med*, 32(1), 7-10.
- Eroğlu, C., Hökelek, M., Güneren, E., Sünbül, M., Aydoğan, S., Uysal, O.A. (2000).** Plastik cerrahide kullanılan sülük (*Hirudo medicinalis*)'lerden izole edilen *Aeromonas hydrophila*'ların antibiyotik duyarlılıkları. 15. *Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi*, Antalya, 551-553.
- EUCAST (2018).** The European committee on antimicrobial susceptibility testing routine and extended international quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 8.0.
- Freitas, M.R., Freire, N.B., Peixoto L.J.S., Oliveira, S.T.L., Souza, R.C., Gouveia, J.J.S., Costa, M.M., Gouveia, G.V. (2018).** The presence of plasmids in *Aeromonas hydrophila* and its relationship with

- antimicrobial and heavy metal-resistance profiles. CR, 49(9), e20170813, 1-6.
- Furmanec-Blaszczak, B. (2014).** Phenotypic and molecular characteristics of an *Aeromonas hydrophila* isolated from the River Nile. Microbiol Res, 169, 547-552.
- Goñi-Urriza, M., Pineau, L., Capdepy, M., Roques, C., Caumette, P., Quentin, C. (2000).** Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. J Antimicrob Chemother, 46, 297-301.
- Gödekmerdan, A., Arusan, S., Bayar, B., Sağlam, N. (2015).** Tıbbi sülükler ve hirudoterapi. Türkiye Parazitol Derg, 35, 234-239.
- Gönenç, B. (2000).** Sülüklerin genel özellikleri, patojenite ve tedavi şekilleri. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 6(1-2), 137-144.
- Hatha, M., Vivekanandhan, A. A., Julie, A., Christol, J. (2005).** Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water. Int J Food Microbiol, 98, 131-134.
- Jaberi, S., Rahmena, M., Shapouri, R. (2014).** Determine of the microbial flora of leeches in North of Iran and designing antimicrobial solution to sterile the leeches. JABS, 8(3), 42-45.
- Jagoda, S.S.S.S., Wijewardana, T. G., Kinoshita, S., Watabe, S., Asakawa, S. (2014).** Characterization and antimicrobial susceptibility of motile aeromonads isolated from freshwater ornamental fish showing signs of septicemia. Dis Aquat Org, 109, 127-137.
- Joseph, A.V., Sasidharan, R.S., Nair, H.P., Bhat, S.G. (2013).** Occurrence of potential pathogenic *Aeromonas* species in tropical seafood, aquafarms and mangroves off Cochin coast in South India. Vetworld, 300-306.
- Kumar, S., Varela, M.F. (2013).** Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. Formatex, 552-534.
- Kusdarwati, R., Rozi, D., Dinda, N., Nurjanah, I. (2017).** Antimicrobial resistance prevalence of *Aeromonas hydrophila* isolates from motile *Aeromonas* septicemia disease. Asean-Fen International Fisheries Symposium, 1-6.
- Litwinowicz, A., Blaskowska, J. (2013).** *Hirudo verbana* is a source of fungal isolates potentially pathogenic to humans. Afr J Microbiol Res, 7(47), 5358-5363.
- Odeyemi, O.A., Ahmad, A. (2017).** Antibiotic resistance profiling and phenotyping of *Aeromonas* species isolated from aquatic sources. Saudi J Biol Sci, 24, 65-70.
- Öztürk, R. (2002).** Antimikrobik ilaçlara karşı direnç geliştirme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu. Akılcı antibiyotik Kullanımı ve Erişkinlerde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi, 31, 83-100.
- Ruppé, E., Cherkaoui, A., Wagner, N., La Scala, G.C., Beaulieu, J.Y., Girard, M., Frey, J., Lazarevic, V., Schrenzel, J. (2018).** In vivo selection of a multidrug resistant *Aeromonas salmonicida* during medicinal leech therapy. New Microbes New Infect, 21, 23-27.
- Sağlam, N. (2018).** The effects of environmental factors on leeches. AAE, 1(1), 1-3.
- Samal, S.K., Das, B. K., Pal, B. B. (2014).** Isolation, biochemical characterization, antibiotic susceptibility study of *Aeromonas hydrophila* isolated from freshwater fish. IJCMAS, 3(12), 259-267.
- Sig, A.K., Güney, M., Üsküdar Güçlü, A., Özmen, E. (2017).** Medicinal leech therapy an overall perspective. IMR, 6, 337-343.
- Tekdal, D. (2009).** *Spirulina platensis* (Cyanophyta)'e elektroporasyon yolu ile gen aktarım olanaklarının araştırılması. Adana, Türkiye, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, 96 sayfa.
- Tripathi, P.S., Ashalatha, M. (2015).** Hirudotherapy-modern twist to ancient science and its relevance in maxillofacial region-a review. IJISR, 20(1), 141-148.
- Verriere, B., Sabatier, B., Carbonelle, E., Mainardi, J.I., Prognon, P., Whitaker, I., Lantieri, L., Hivelin, M. (2016).** Medicinal leech therapy and *Aeromonas* spp. infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 35, 1001-1006.
- Whitaker, I.S., Maltz, M., Siddall, M.E., Graf, J. (2014).** Characterization of the digestive tract microbiota of *Hirudo orientalis* (medicinal leech) and antibiotic resistance profile. Plastic and Reconstructive Surgery. 193(3), 408e-418e.
- Yücel, N., Aşım, B., Bayatlı, Y. (2005).** Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species isolated from retail fish in Turkey. J Food Quality, 28, 313-324.
- Zhou, G., Shiq S., Huang, X.M., Xie, X.B. (2015).** The three bacterial lines of defense against antimicrobial agents. Int J Mol Sci, 16, 21711-21733.

Canine masticatory myositis in a Rottweiler breed dog**Rottweiler ırkı bir köpekte kanin mastikatör kas miyozitisi****ABSTRACT**

Canine masticatory muscle myositis is an autoimmune disease in which the reasons are unclear. This muscle myositis generally seen in large dog breeds. General symptoms are pain and atrophy in the chewing muscle group, difficulty in opening the jaw and weight loss. This case was 2 years old, castrated male, Rottweiler breed dog which was brought to the Istanbul University-Cerrahpaşa Faculty of Veterinary Science Hospital with the complaints of face swelling and difficulty in chewing for 2 weeks. Complete blood count and serum biochemistry was carried out and eosinophilia was determined. Computed tomography was used to detect structural changes in masticatory muscles and masticatory muscle myositis was diagnosed. Cortisone treatment and laser therapy were carried out together with classical treatment to reduce the pain. In the following days, due to dysphagia and anorexia, euthanasia was decided.

Keywords: Canine, Computed tomography, Masticatory, Myositis

ÖZET

Kanin mastikatör kas miyozitisi otoimmün bir hastalık olup nedeni tam olarak belli değildir. Bu hastalık genellikle büyük köpek ırklarında görülmektedir. Genel semptom olarak ağrı ve çiğneme kası grubunda atrofi, çenenin açılmasında zorluk ve kilo kaybı gözükür. Bizim olgumuzu İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi'ne yüzünde şişlik ve çiğnemede 2 haftadır zorluk şikâyeti bulunan 2 yaşında kısırlaştırılmış rottweiler ırkı bir köpek oluşturdu. Tam kan sayımı ve serum biyokimyası yapıldı ve eozinofili tespit edildi. Mastikatör kastaki yapısal değişiklikleri tespit edebilmek ve tanıyı koyabilmek amacıyla bilgisayarlı tomografi kullanıldı. Zaman kaybetmeden kortizon terapisine başlandı ve ağrıyı azaltmak için klasik tedavinin yanına lazer terapisi eklenildi. İlerleyen günlerde besleme zorluğu ve buna bağlı kilo kaybı oluştuğu için ötenazi önerildi.

Anahtar Kelimeler: Köpek, Bilgisayarlı tomografi, Mastikatör, Miyozitis

INTRODUCTION

Muscle myositis is an autoimmune disease that causes focal inflammatory myopathy and causes the clinical limitation of the chewing muscle group containing the temporalis, masseter, pyterigoideus and rostral digastricus muscles, innervated by the mandibular arm of the trigeminal nerve (Melmed et al., 2004). Masticatory muscle myositis (MMM) appears to be a dog specific disease (Shelton, 2007). Canine masticatory myositis causes progressive destruction of type 2M muscle fibers by making focal myositis (Bolf et al., 2011).

How to cite this article

Karan, B., Karabağlı, M., and Özer, K. (2019). Canine masticatory myositis in a Rottweiler breed dog. *J Adv VetBio Sci Tech*. 4(2): 67-71. <http://doi.org/10.31797/vetbio.499518>

Case Report

Bahadır Karan^{1a}
Murat Karabağlı^{1b}
Kürşat Özer^{1c}

¹ Istanbul University-Cerrahpaşa, Faculty of Veterinary Medicine, Surgery Department, 34320, Avcılar/Istanbul Turkey

^aORCID: 0000-0003-0227-3785

^bORCID: 0000-0002-3936-1730

^cORCID: 0000-0002-6765-2287

Correspondence

Bahadır Karan,DVM,
vetbaho26@gmail.com

Article info

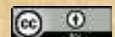
Submission: 19-12-2018

Accepted: 15-05-2019

Online published: 08-08-2019

published: 31-08-2019

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



e-ISSN: 2548-1150

website: <http://dergipark.gov.tr/vetbio>

doi prefix: [10.31797/vetbio](http://doi.org/10.31797/vetbio)

The etiology of this disease is unknown, but it is thought that myositis may originate from antibodies produced in response to an infectious agent that cross-reacts with endogenous antigens. Others have suggested that early myofibril damage in dogs with masticator myositis is initiated by cytotoxic CD8 + T cells and subsequently leads to antibody production against muscle fiber proteins (Reiter et al., 2007). The most common clinical symptoms of this disease include difficulty in opening the jaw, pain in the jaw and masticatory muscle (Evans et al., 2004). Computed tomography provides excellent sensitivity in examining the characteristics of the bones and soft tissues of the head region (Reiter et al., 2007). The aim for this study was to point out the usefulness and success of computed tomography imaging especially in the changes in masticatory muscle groups in canine masticatory myositis.

Case presentation

Two years old, male, Rottweiler dog was brought to our hospital with a complaint of swelling in both sides of her face according the owner's information; that the bulge had started 2 weeks ago with an excessive amount of saliva in the mouth and that non-steroidal anti-inflammatory drug (meloxicam) and antibiotic (marbofloxacin) were prescribed in a private clinic. Bilateral swelling was detected in the region corresponding to the masseter muscles on the lateral side of the mandible and more prominently on the left side. In addition, the presence of episcleral congestion and exophthalmos was detected (Fig 1).



Figure 1: Appearance of the dog's head region and eye in the first clinical examination.

Şekil 1: Köpeğin ilk klinik muayenesinde baş bölgesinin ve gözünün görünümü.

The patient was anaesthetized with propofol due to its aggressive disposition and a clinical examination was performed. Clinical examination revealed no atrophy of the temporalis muscles but very stiff swelling of the masseter muscles was observed. No fluid content in saliva, abscess, cyst, hematoma or collection character was observed after puncture. The swelling on the left side was much larger than the right side. At this stage, the patient's mouth was opened to examine the teeth, gums and other structures in the mouth, but the mouth could only be opened to allow the tongue to come out. The distance between the mandibular and maxillary 1st incisive teeth was 3 cm. It was not possible to examine the patient's mouth.

Imaging Finding

Lateral and ventrodorsal radiographs of the patients head region were obtained but no radiographic findings were detected. The computed tomography examination of the skull was decided. Sections were taken at 2 mm intervals with SHIMADZU sct-7800 tc model computed tomography. 3D modeling of the computed tomography images was performed and the bone roof, fracture, luxation and degenerative findings were examined but no abnormality was found (Fig 2).



Figure 2: Left lateral (a), ventrodorsal (b), right lateral (c) and dorsoventral (d) images of the cranium after 3D modeling. Mandibular body (CM), Masseteric Fossa (MF), Zygomatic Arch (AZ), Condylar Process (white asterisk), Coronoid Process (white arrow).

Şekil 2: 3D modellemeyi takip eden sol lateral (a), ventrodorsal (b), sağ lateral (c), dorsoventral görüntüler (d). Mandibular Gövde (CM), Masseterik Fossa (MF), Zigomatik Ark (AZ), Kondiler Çıkıntı (beyaz asterisk), Koronoid Çıkıntı (beyaz ok).

When axial sections were examined, hypoattenuated areas were detected in masseter, temporalis and pterygoideus muscles. Thus, computed tomography findings of masticatory myositis were also detected (Fig 3).



Figure 3: Axial cross-section taken at the level of ramus mandible on computed tomography examination. Masseter muscle (M), Temporalis muscle (T), Pterigoideus muscle (P), Normal muscle attenuation (white asterisks), Hypoattenuated areas in 3 masticatory muscles (white arrow heads).

Şekil 3: Bilgisayarlı tomografide mandibular ramus hizasında alınan aksiyel kesit. Masseter kası (M), Temporalis kası (T), Pterigoideus kası (P), Normal kas attenuasyonu (beyaz asteriskler), 3 çiğneme kasındaki hipoatenü alanlar (beyaz ok başları).



Figure 4: An axial section on computed tomography examination. Musculus Digastricus in the ventral of the mandible (D). Digastricus muscle were observed in normal attenuation, unlike the other 3 masticatory muscles.

Şekil 4: Bilgisayarlı tomografide aksiyel kesit. Mandibulanın ventralinde musculus digastricus (D). Diğer 3 kas grubunun aksine digastricus kasının normal attenuasyonu.

While other axial sections were examined, no other hypoattenuated areas were found in the digastricus muscles compared to the other 3 muscles (Fig 4).

When the other sections were examined, there was also a significant hypertrophy in the mandibular lymph nodes, especially in the caudal area of the cranium (Fig 5).



Figure 5: On computed tomography examination, an axial section in the region immediately corresponding to the caudal to the cranium. Bilateral hypertrophy in mandibular lymphnodes (white asterisks).

Şekil 5: Bilgisayarlı tomografide kraniyumun hemen kaudaline kalan bölgede aksiyel kesit. Mandibular lenf nodüllerinde bilateral hipertrofi (beyaz asteriskler).

Diagnosis and finding

During the initial examination a blood was collected and laboratory examination was performed. There was an increase in eosinophil values on hemogram. The normal range was 0.06 - 1.23 K / μ L and the eosinophil value was 1.76 K / μ L. Eosinophil level was found to be within normal limits in blood tests performed at next follow-up. A muscle biopsy was not performed. The patient was diagnosed with masticatory myositis and started corticosteroid treatment because of the eosinophil increase observed in the patient's blood examination, inability to open the jaw, and absence of any additional findings that would lead to the clinical state observed on the

computed tomography. Methylprednisolone sodium succinate was prescribed 6 mg / kg on the first day and 4 mg / kg on the next 4 days and 3 mg / kg on the next 4 days. On the 5th day examination, hypertrophy of the masseter muscles regressed and atrophy started to develop in temporalis muscles (Fig 6).



Figure 6: The appearance of atrophic temporalis muscles 5th days after the treatment.

Şekil 6: Hastanın 5. günündeki muayenesinde atrofiye olmuş temporal kasların görüntüsü

The patient could open his mouth more and eat more easily. On the 10th day follow-up examination, the patient was able to open his mouth 6 cm and was still in pain. On the same day, laser treatment was initiated to further reduce pain. It was decided to perform the therapy 3 days a week (Monday-Wednesday-Friday) at intervals of one day. During 3rd laser session, dog could eat more easily. In examination, the pain in the masseter muscles was decreased but no change was observed in temporalis muscles. However, there was no improvement in the muscles, so the

patient's health status got worse the following days. For these reasons euthanasia was decided.

DISCUSSION

Inflammatory myopathies are most common in dogs and are most commonly seen as masticatory muscle myositis (Nanai et al., 2009). Muscle myositis is an inflammatory myopathy and selectively affects the chewing muscles of temporalis, masseter, pyterigoideus and digastricus muscle groups. This muscle group contains 2M myofibrils, which are specific to this muscle group and are not found in the extremities (Paciello et al., 2007). In dogs in the acute phase of the disease, typically bilateral swelling, painful masticatory muscles, jaw pain and trismus are seen. Even under general anesthesia, the jaws often cannot be opened. In chronic cases, the muscles are atrophic and the trismus may continue (Czerwinski et al., 2015). In this case the dog had pain in the jaw, difficulty in opening the jaw, pain in the masseter muscles and atrophy of the temporalis muscles. He could barely open her jaw under anesthesia.

This disease was formerly called eosinophilic myositis or atrophic myositis (Melmed et al., 2004). Although some dogs have eosinophilia, this finding does not appear to be consistent. In the literature, predominant cell-type infiltrating the masticatory muscles is eosinophils (Reiter et al., 2007). The laboratory examinations revealed elevated levels of eosinophils in the blood (1,76 K/ μ L).

Diagnostic imaging plays a key role in the diagnosis of many diseases, including retrobulbar diseases and myositis, the causes of exophthalmus and strabismus, retrobulbar abscesses, tumors and polymyositis, foreign body, temporomandibular joint instability due to fracture or luxation (Czerwinski et al. 2015). Traditional radiography is commonly used to eliminate skeletal abnormalities in dogs that cannot open their mouths (Reiter et al., 2007). In this case, computed tomography examination was used. The aim of this study was to diagnose masticatory muscle myositis with computed tomography examination and other diagnostic methods. Computed tomography examination provides excellent sensitivity in the characteristics of the bones and soft tissues of the head region (Reiter et al., 2007).

Magnetic resonance imaging (MRI) is used as an adjunctive test for myopathies in human health. However, its use in animal health has not been fully described (Czerwinski et al., 2015). For this reason, we preferred computed tomography instead of MRI.

As a result, the clinical, laboratory and radiological (computed tomography) findings obtained by presenting this study were similar with the previous studies and the patient was diagnosed with masticatory muscle myositis.

REFERENCES

- Bolfa, P., Mureşan, C., Gal, A., Taulescu, M., Cuc, C., Borza, G., Nagy, A., Tabran, F., Nadas, G., Catoi, C. (2011).** Masticatory Myositis of a Dog – Case Study. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*, 68, 1, 83-86. [10.15835/buasvmcn-vm:1:68:6733](https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:1:68:6733)
- Czerwinski, S.L., Plummer, C.E., Greenberg, S.M., Craft, W.F., Conway, J.A., Perez, M.L., Cooke, K.L., Winter, M.D. (2015).** Dynamic exophthalmos and lateral strabismus in a dog caused by masticatory muscle myositis. *Vet Ophthalmol*, 18,6, 515-520. <https://doi.org/10.1111/vop.12260>
- Evans, J., Levesque, D., Shelton, G.D. (2004).** Canine Inflammatory Myopathies: A Clinicopathologic Review of 200 Cases. *J Vet Inter Med* 18, 679–691. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2004.tb02606.x>
- Melmed, C., Shelton, G.D., Bergman, R., Barton, C. (2004).** Masticatory Muscle Myositis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Compendium, Contin Educ Vet*, 590-605.
- Nanai, B., Phillips, L., Christiansen, J., Shelton, G.D. (2009).** Life Threatening Complication Associated with Anesthesia in a Do with Masticatory Muscle Myositis. *Vet Surg*, 38, 645-649. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2009.00515.x>
- Paciello, O., Shelton, G.D., Papparella, S. (2007).** Expression of major histocompatibility complex class I and class II antigens in canine masticatory muscle myositis. *Neuromuscul Disord*, 17, 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.01.012>.
- Reiter, A.M., Tobias, Schwarz T. (2007).** Computed tomographic appearance of masticatory myositis in dogs: 7 cases (1999–2006). *J Am Vet Medical Assoc*, 231, 924-930. <https://doi.org/10.2460/javma.231.6.924>
- Shelton, G.D. (2007).** From dog to man: The broad spectrum of inflammatory myopathies. *Neuromuscul Disord*, 17, 663–670. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.06.466>.