

e-ISSN 2146-7188

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

*Harran University  
Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*



*Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınıdır  
Published by Harran University Faculty of Veterinary Medicine*

YIL/YEAR: 2022 CİLT/VOLUME: 11 SAYI/ISSUE: 1

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Harran University  
Journal of The Faculty of Veterinary Medicine

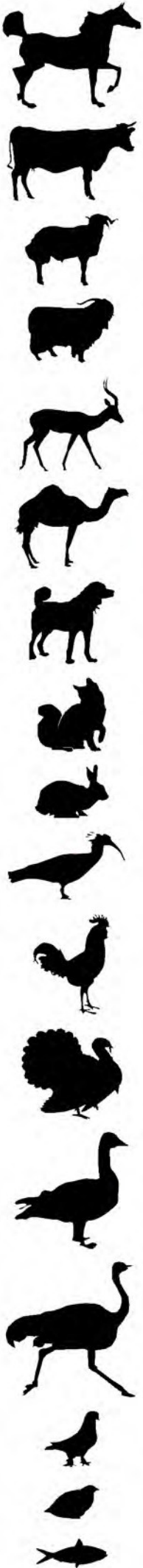


Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınıdır  
Published by Harran University Faculty of Veterinary Medicine

YIL/YEAR:2022

CİLT/VOLUME:11

SAYI/ISSUE: 1



# HARRAN ÜNİVERSİTESİ

## VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Harran University  
Journal of the Faculty of Veterinary Medicine

**Harran Üniversitesi**  
**Veteriner Fakültesi Adına**  
**Sahibi/Owner**  
Prof. Dr. Nihat DENEK  
**Dekan/Dean**

**Baş Editör/Editor in Chief**  
Prof. Dr. Oktay KESKİN

**Editörler Kurulu/Editorial board**  
Prof. Dr. Füsün TEMAMOĞULLARI  
Prof. Dr. Şükrü GÜRLER  
Doç. Dr. Rahşan YILMAZ  
Doç. Dr. Deniz KORKMAZ  
Doç. Dr. Serap KILIÇ ALTUN  
Doç. Dr. Birten EMRE

**İngilizce Editörü/English Editor**  
Prof. Dr. Ayşe Menteş GÜRLER

**Mizanpaj Editörü/Layout Editor**  
Dr. Öğr. Üyesi İrfan ÖZGÜNLÜK

**Dergi Sekreteri/Journal Secretary**  
Arş. Gör. Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE

**Yazışma /Correspondence**  
Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi  
Editörlüğü Eyyübiye Kampüsü, 63200 -  
Şanlıurfa/TÜRKİYE  
**Tel: +90 414 318 38 59**  
**+90 414 318 38 55**  
**Faks: +90 414 318 39 22**  
**e-mail: harranvet@gmail.com**

*Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi Hakemli Bir Dergi Olup, Yılda 2(iki) Sayı Olarak Yayınlanır. ULAKBİM (Yaşam Bilimleri Veri Tabanı), Türkiye Atıf Dizini, Cab abstracts, Index Copernicus, Zoological Record, SOBIAD gibi ulusal ve uluslararası indeksler tarafından taranmaktadır.*

Yıl/Year: 2022- Cilt/Volume: 11 Sayı/Issue 1

### Danışma Kurulu/Advisory Board

Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Ali Reha AĞAOĞLU, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniv. Vet. Fak. Burdur, Türkiye.  
Prof. Dr. Alkan KAMILOĞLU, Kafkas Üniv. Vet. Fak. Kars, Türkiye.  
Prof. Dr. Anila HODA, Agric. Uni. of Tirana, Fac. of Agric.& Environ. Tirana, Albania.  
Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK, Selçuk Üniv. Vet. Fak. Konya, Türkiye.  
Prof. Dr. Bülent ULUTAŞ, Aydın Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak. Aydın, Türkiye.  
Prof. Dr. Ender YARSAN, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Ergun AKÇAY, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Gerald REINER, Justus-Liebig Uni. Fac. of Vet. Med. Giessen, Germany.  
Prof. Dr. Gülay ÇİFTÇİ, Ondokuz Mayıs Üniv. Vet. Fak. Samsun, Türkiye.  
Prof. Dr. Halil Selçuk BİRİCİK, Afyon Kocatepe Üniv. Vet. Fak. Afyonkarahisar, Türkiye.  
Prof. Dr. Hasan EREN, Aydın Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak. Aydın, Türkiye.  
Prof. Dr. Kazım ŞAHİN, Fırat Üniv. Vet. Fak. Elazığ, Türkiye.  
Prof. Dr. Manzoor Ur Rahman MIR, SKUAST Kashmir Fac. of Vet. Sci. & Anim. Husbandry. Kashmir, India.  
Prof. Dr. Mehmet Emin TEKİN, Selçuk Üniv. Vet. Fak. Konya, Türkiye.  
Prof. Dr. Muammer GÖNCÜOĞLU, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Murat YILDIRIM, Kırıkkale Üniv. Vet. Fak. Kırıkkale, Türkiye.  
Prof. Dr. Narin LİMAN, Erciyes Üniv. Vet. Fak. Kayseri, Türkiye.  
Prof. Dr. Osman KUTSAL, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Rahşan ÖZEN, Fırat Üniv. Vet. Fak. Elazığ, Türkiye.  
Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Doç. Dr. İlknur PİR YAĞCI, Kırıkkale Üniv. Vet. Fak. Kırıkkale, Türkiye.  
Prof. Assoc. Dr. Sokol DURO, Agricultural University of Tirana. Fac. of Vet. Med. Tirana, Albania.  
Dr. Kushvar Mammadova, Azerbaijan State Agricultural Univ, Fac. of Vet. Med. Gence Azerbaycan.  
Dr. Tomasz Szara, Institute of Veterinary Medicine. Warsaw, Poland.

**Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**  
**2022 Yılı 11. Cilt 1. Sayı Hakem Listesi (alfabetik sıra)**  
**The Referees List of This Issue (in alphabetical order)**

Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Abuzer ACAR	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ahmet AKKOÇ	Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Armağan Erdem ÜTÜK	Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Armağan HAYIRLI	Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Aşkın YAŞAR	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ayşe TOPAL	Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Bülent TEKE	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Bülent ULUTAŞ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Esra ŞEKER	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Halil SELÇUKBİRİCİK	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. İsmail Hakkı EKİN	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Kader YILDIZ	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Mehmet ÇAY	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Meryem EREN	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Metin PETEK	Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Özkan ASLANTAŞ	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Selami SELVİ	Balıkesir Üniversitesi Altınoluk Meslek Yüksekokulu
Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Tülay BÜYÜKOĞLU	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM	Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Cengiz ÜNSAL	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Didar AYDIN KAYA	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Güzin ÖZKURT	Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Halit Deniz ŞİRELİ	Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Doç. Dr. İbrahim AKIN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Mehmet Önder KARAYİĞİT	Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Mustafa Orhun DAYAN	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Rahime YAYGINGÜL	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Ramazan İLGÜN	Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Semra GÜRBÜZ	Mardin Artuklu Üniversitesi Turizm Fakültesi
Doç. Dr. Simten YEŞİLMEN ALP	Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Şule SANAL	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Tugay AYAŞAN	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi
Doç. Dr. Tuğrul ERTUĞRUL	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Nihat TELLİ	Konya Teknik Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu
Dr. Öğr. Üyesi Gökçe ÖZDEMİR	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Gözde YÜCEL TENKEKİ	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Irmak DİK	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Kemal AKSOY	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Milas Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Lütfi TAKCI	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Tuba ÖZGÖÇER	Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Tuğra AKKUŞ	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğretim Görevlisi Deniz KARAKÇI	Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi



**İçindekiler / Contents**

**Araştırma Makaleleri / Research Articles**

**Sayfa /Page**

1. Geometric Morphometric Analysis on the skull of the Red Fox (*Vulpes vulpes*)  
Kızıl Tilkilerde (*Vulpes vulpes*) Kafatasının Geometrik Morfometrik Analizi  
**İftar GÜRBÜZ, Yasin DEMİRASLAN, Funda AKSÜNGER KARAACI, Osman YILMAZ, İsmail DEMİRCİOĞLU** 1-7
2. *Toxocara cati* ile Doğal Enfekte Kedilerde Fenbendazol+Pyrantel Pamoate ve Praziquantel Kombinasyonunun Etkinliğinin Belirlenmesi Determination of the Efficacy of Fenbendazol+Pyrantel Pamoate and Praziquantel Combination in Naturally Infected Cats with *Toxocara cati*  
**Hakkı Seçkin ÇETİN, Ömür ÖZERHUN, Faruk KÜÇÜKYILDIZ** 8-13
3. Histological Structure of the Plastinated Kidney Following Deplastination  
Deplastinasyon Sonrası Plastine Böbreğin Histolojik Yapısı  
**Saime Betül BAYGELDİ, Uğur ŞEKER, Barış Can GÜZEL** 14-20
4. The Effect of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) and *Nigella sativa* (Black Cumin) Oils on Wound Healing in Type-1 Diabetic Mice  
*Hypericum perforatum* (Sarı Kantaron) ve *Nigella sativa* (Çörek Otu) Yağlarının Tip-1 Diyabetik Farelerde Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi  
**İbrahim AKIN, Yalçın Alper ÖZTURAN, Cansu AKDOĞAN, Yılmaz KALKAN, Özge ÇEVİK, Aykut Göktürk ÜNER** 21-27
5. Determination of Alpha S1-Casein, Beta-Lactoglobulin, Some Biochemical and Mineral Levels in Milk of Different Animals  
Farklı Hayvanların Sütlerinde Alfa S1-Kazein, Beta-Laktoglobulin, Bazı Biyokimyasal ve Mineral Düzeylerinin Belirlenmesi  
**Tuğçe Ayşen ŞENSOY, Gülay ÇİFTÇİ** 28-36
6. Etlik Piliçlerde Işık Şiddeti ve Tüneğin Korku ve Stres Reaksiyonları ile Bazı Et Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi  
Effect of Light Intensity and Perch on Fear and Stress Reactions and Some Meat Quality Characteristics in Broilers  
**Evrin DERELİ FİDAN, Erdi Ziya OKUR** 37-42
7. Kedi ve Köpeklerde Metakarpal ve Metatarsal Kırıkların Tedavisi (32 Vakada Retrospektif Değerlendirme)  
Treatment of Metacarpal and Metatarsal Fractures in Cats and Dogs (Retrospective Evaluation of 32 Cases)  
**Mehmet Zeki Yılmaz DEVECİ, Muhammed Enes ALTUĞ, İbrahim ALAKUŞ, Ziya YURTAL, Ömer KIRGIZ, Halil ALAKUŞ, Eren CEYLAN, Cafer Tayer İŞLER** 43-50
8. Dünyada ve Türkiye'de Hayvan Haklarının Mevcut Anayasal Konumu  
The Current Constitutional Position of Animal Rights in the World and Türkiye  
**Çağrı Çağlar SİNMEZ** 51-57
9. Deneysel Akut Pankreatit Oluşturulan Ratlarda Lipit Profil Üzerine Timokinonun Etkileri  
Effects of Thymoquinone on Lipid Profile in Rats with Experimentally Acute Pancreatitis  
**Sevim KANAÇ, Deniz ULUIŞIK, Ercan KESKİN** 58-65
10. Beyaz Peynir Örneklerinden *Staphylococcus aureus* Suşlarının İzolasyonu, Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) Direnç Fenotipleriyle, Metisilin ve Vankomisin Duyarlılıklarının Belirlenmesi  
Isolation of *Staphylococcus aureus* Strains from White Cheese Samples, Determination of Methicillin and Vancomycin Susceptibility with Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) Resistance Phenotypes  
**Alper GÜNGÖREN, Ayşegül DEMİRCİOĞLU, Ahmet Murat SAYTEKİN** 66-72

11. Immunohistochemical Evaluation of Syndecan-1 Expression in the Liver of Small Ruminants with Natural Liver Fluke Infection  
Karaciğer Kelebekleriyle Doğal Enfekte Küçük Ruminant Karaciğerlerinde Sindekan-1 Salınımının İmmunohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi  
**Nihat YUMUŞAK, Kürşat FİLİKCİ** 73-77
12. Investigating Relationships between Catalase, Reduced Glutathione, Malondialdehyde, Vitamin C, and Total Protein Levels in Simmental Cow's Milk and Milk Cells  
Simmental İnek Sütü ve Süt Hücrelerinde Katalaz, İndirgenmiş Glutatyon, Malondialdehit, Vitamin C ve Total Protein Düzeyleri Arasındaki İlişkilerin Araştırılması  
**Filiz KAZAK, Pinar PEKER** 78-83
13. The Effect of Pistachio Shell, Pomegranate Hull, and Olive Pulp Feeding on Milk Yield, Milk Quality, and Some Biochemical Blood Parameters in Sheep  
Koyunlarda Fıstık Kabuğu, Nar Kabuğu ve Zeytin Pirinasi ile Beslemenin Süt Verimi, Süt Kalitesi ve Bazı Kan Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkisi  
**Mücahit KAHRAMAN, Ebru SAKAR2, Sabri YURTSEVEN, Aydın DAŞ, Hamza YALÇIN, Mehmet AVCI, Gülşah GÜNGÖREN, Besime DOĞAN DAŞ, Adem ŞAHAN, Kasım TAKIM, Bekir EROL AK.** 84-92
14. Comparison of the Results of Automatic Blood Analyser and Manual Peripheral Smear Method in Total and Differential Leukocyte Count in Goats  
Keçilerde Total ve Diferansiyel Lökosit Sayımlarında Otomatik Kan Analizörü ve Manuel Periferik Yayma Yöntemi Sonuçlarının Karşılaştırılması  
**Gülten Emek TUNA** 93-99
15. Şanlıurfa Bölgesinde Sığırlarda Paratüberküloz Seroprevalansının Belirlenmesi  
Seroprevalence of Paratuberculosis in Cattle in Sanliurfa Region  
**Ali ÇELİK, Yaşar TEL** 100-105
16. Morphological Characteristics of Şanlıurfa Yapaşan (Tumbler) Pigeons (*Columba livia domestica*)  
Şanlıurfa Yapaşan (Tumbler) Güvercinlerin (*Columba livia domestica*) Morfolojik Özellikleri  
**Romedi ÇELİK** 106-112
17. Investigation of the Efficacy and Antifungal Drug Resistance of Non-Albicans *Candida* Species in Mycotic Mastitis  
Mikotik Mastitislerde Non-Albicans *Candida* Türlerinin Etkinliğinin ve Antifungal İlaç Dirençlerinin Araştırılması  
**Hafize Tuğba YÜKSEL DOLGUN, Şükrü KIRKAN, Volkan ÖZAVCI** 113-119
18. Şanlıurfa İlindeki İshalli Buzağlarda Bovine Coronavirus Varlığının ELISA Yöntemi ile Araştırılması  
Investigation of the Presence of Coronavirus by ELISA Method in Diarrheic Calves in Sanliurfa Province  
**Ramazan ABİKOĞLU, İrfan ÖZGÜNLÜK** 120-127
- Olgu Sunumu/Case Report**
19. Poisoning of sheep by Babrik Plant (*Cionura erecta* (L.) Griseb.) in Şanlıurfa / Turkey  
Şanlıurfa (Türkiye)'de Koyunlarda Babrik Bitkisi zehirlenmesi (*Cionura erecta* (L.) Griseb)  
**Kasım TAKIM, Hasan AKAN, Hikmet DİNÇ, Abdullah GÖKMEN** 128-131
- Derleme/Review**
20. Approach to Acute Phase Reactions in the Aspects of Pathology and General Situation in Turkey  
Akut Faz Reaksiyonlarına Patoloji Açısından Yaklaşım ve Türkiye'deki Genel Durum  
**Belma DAYI, Alper SEVİMLİ** 132-138

## Geometric Morphometric Analysis on the skull of the Red Fox (*Vulpes Vulpes*)

İftar GÜRBÜZ<sup>1,a,\*</sup>, Yasin DEMİRASLAN<sup>1,b</sup>, Funda AKSÜNGER KARAACI<sup>2,c</sup>, Osman YILMAZ<sup>3,d</sup>, İsmail DEMİRCİOĞLU<sup>4,e</sup>

<sup>1</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Burdur, Türkiye.

<sup>2</sup>Bingöl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Bingöl, Türkiye.

<sup>3</sup>Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Van, Türkiye.

<sup>4</sup>Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0001-9460-0645, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0003-3612-6142, <sup>c</sup>ORCID: 0000-0001-8311-1723, <sup>d</sup>ORCID: 0000-0003-2013-9213, <sup>e</sup>ORCID: 0000-0002-0724-3019

Geliş Tarihi: 21.10.2021

Kabul Tarihi: 08.11.2022

**Abstract:** This study was carried out to determine the shape of the fox skull by the geometric morphometric method according to gender. For this purpose, four female and nine male fox skulls were used. The skulls were photographed from the dorsal and lateral aspects. Eleven homologous landmarks on the dorsal aspect and 19 homologous landmarks on the lateral aspect were marked on the photographs of the skull. Principal component analysis and Relative warp analysis were performed on the coordinate values of the images. In addition, MorphoJ software was used to determine the shape differences and directions of the landmarks. According to principal component analysis, male and female individuals were mainly concentrated to the y axis's right on lateral images, and female and male individuals were not concentrated in one region on dorsal images. Therefore, according to the principal component analysis, no significant gender difference was found. The consensus graph determined that the oral edge of the incisive tooth and the cranial edge of the canine tooth in females were ventrally directed compared to males. It is thought that the findings obtained as a result of the study will contribute to zooarchaeological and taxonomic research.

**Keywords:** Geometric morphometry, MorphoJ, Red fox, Skull.

### Kızıl Tilkilerde (*Vulpes vulpes*) Kafatasının Geometrik Morfometrik Analizi

**Özet:** Bu çalışma, tilki kafatasının cinsiyete göre geometrik morfometrik yöntemle şekilsel durumunun belirlenmesi amacıyla yapıldı. Bu amaçla 4 dişi ve 9 erkek tilki kafatası kullanıldı. Kafatasları dorsal ve lateral yönlü olarak fotoğraflandı. Kafataslarının dorsal görüntüleri üzerinde 11, lateral görüntüleri üzerinde 19 homolog landmark işaretlendi. Görüntülerden elde edilen koordinat değerlerinde temel bileşenler analizi ve Relative warp analizi yapıldı. Ayrıca işaretlenen landmarkların şekil farklılıklarını ve yönlerini belirlemek amacıyla MorphoJ yazılımı kullanıldı. Temel Bileşenler analizine göre, lateral görüntülerde dişi ve erkek bireylerin büyük oranda y ekseninin sağına toplandığı, dorsal yönlü görüntülerde ise dişi ve erkek bireylerin bir bölgeye yoğunlaşmadığı tespit edildi. Dolayısıyla Temel Bileşenler analizine göre belirgin bir cinsiyet farklılığına rastlanmadı. Konsensus grafiğine göre ise, dişilerde incisiv dişin oral kenarı ile canin dişin cranial kenarının erkekler için ventral yönlü olduğu belirlendi. Çalışma sonucunda elde edilen bulguların zooarkeolojik ve taksonomik araştırmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Geometrik morfometri, Kafatası, Kızıl tilki, MorphoJ.

### Introduction

The red fox (*Vulpes Vulpes*) belongs to the order Carnivora. Between the carnivorous, its habitat has one of the most common geographical intervals, and they are located in Europe, Asia, North Africa, and North America (Wozencraft, 2005). The red foxes are strict protection by law in Turkey (Animal Protection Law, 2004).

The carnivores are highly varied in magnitude, diet, social behavior, movement and activity patterns (Kruuk, 2002). This variability is reflected in the dimensions and shape of skulls (Tamlin et al., 2009). Therefore, the morphological structure of the skull is affected by factors such as individual features, genetic, environmental impacts, growth

and gender. In evaluating the morphological structure of the skull, traditional craniometric analysis is an essential tool for studies. However, morphological variations can be determined by the geometric morphometric method frequently used in recent years, which allows the skull to be evaluated in shape (Kistner et al., 2021).

Homolog landmarks are used in geometric morphometry and the geometric structure of the samples is digitized in cartesian coordinates. Thus, the sample is examined in shape (Higgins, 2000; Slice, 2007). Slice (2007) reported that the geometric morphometric method has provided more appropriate data for statistical analysis than

traditional morphometric studies. Geometric morphometric studies are available in different species in the literature (Demiraslan et al., 2021; Demircioğlu et al., 2021; Duro et al 2021; Gündemir et al., 2020a; Gündemir et al., 2020b; Gürbüz et al., 2020; Yalçın et al., 2010). This study aimed to determine by the geometric morphometric analysis on the skull of adult red foxes in Turkey.

## Material and Methods

### Ethical approval

Ethical permission of the study was obtained from "Harran University Animal Experiments Local Ethics Committee (Date: 13.07.2020, No: 2020/003)".

### Material

A total of 13 adult fox skulls, four female and nine male, were used in the study. These foxes that died in a traffic accident or poaching were obtained from Turkey's Mediterranean and Southeastern

Anatolia regions between 2010-2015. The skulls were without any deformation or pathological findings.

### Geometric morphometric analysis

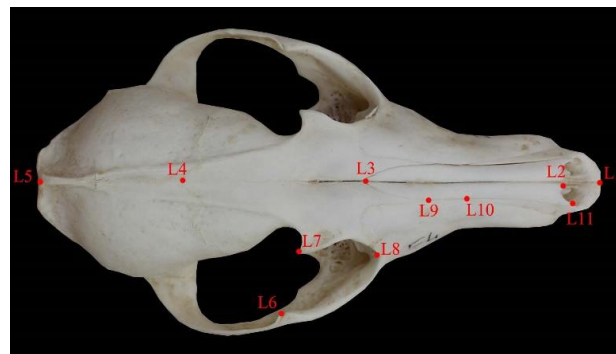
Fox skulls were photographed lateral and dorsal at a distance of 30 cm (Canon EOS 650D, Japan). The images were saved to the computer in JPEG format. These images were converted to tps format in TpsUtil (Version 1.79) software (Rohlf, 2019). Nineteen homologous Landmarks (L) (Figs 1 and 2.) on lateral images and 11 homolog landmarks on dorsal images were marked with TpsDig2 (Version 2.31) (Rohlf, 2018) software. A homologous landmark confirmation test was performed using TpsSmall (Version 1.34) (Rohlf, 2017) software.

In the TPS small analysis, the slope and correlation values of the landmarks for lateral were found to be 0.996153 and 0.999997, respectively. The slope and correlation values for dorsal were 0.999783 and 1.0000, respectively. These values show that the landmarks are placed correctly.



**Figure 1.** Lateral landmarks (L) of the male one.

L1. The most cranial point of os incisivum, L2. The cranial point of os nasale, L3. The caudal point of os nasale, L4. The craniodorsal point of orbita, L5. The caudal point of margo supraorbitalis, L6. The caudal point of crista sagittalis externa, L7. The medial point of back of the cranium, L8. The distal point of condylus occipitalis, L9. Dorsal point of porus acusticus externus, L10. The point of processus retroarticularis, L11. The caudal juncture of arcus zygomaticus, L12. The point of processus hamatus, L13. The cranial juncture of arcus zygomaticus, L14. The point of tuberculum maxillare, L15. The caudal point of third molar tooth, L16. The caudal point of first molar tooth, L17. The cranial point of first molar tooth, L18. The caudal point of canine tooth, L19. The cranial point of canine tooth.



**Figure 2.** Dorsal landmarks (L) of the male one.

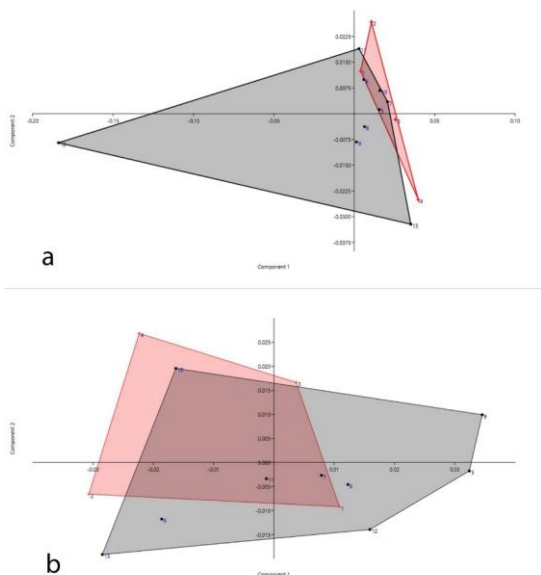
L1. The cranial point of os incisivum, L2. Medial point of processus septalis, L3. The caudal point of os nasale, L4. The frontoparietal juncture in the medial point, L5. The caudal point of crista sagittalis externa, L6. The medial point of arcus zygomaticus, L7. Processus zygomaticus of os frontale, L8. The most cranial point of orbita, L9. Juncture between os nasale, os maxillare and os lacrimale, L10. The point of nasoincisiva, L11. Lateral point of processus septalis.



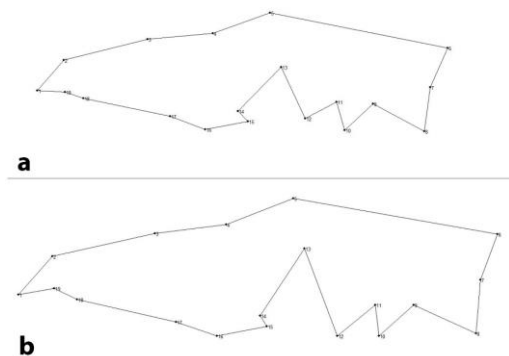
**Table 1.** Result of principal component analysis on lateral and dorsal images of skulls.

Lateral			Dorsal		
PC	Eigenvalue	% variance	PC	Eigenvalue	% variance
1	0,00320545	73,609	1	0,000475544	38,209
2	0,000267159	6,1349	2	0,000196094	15,756
3	0,000217846	5,0025	3	0,000163131	13,107
4	0,00016198	3,7196	4	0,000126653	10,176
5	0,000137926	3,1673	5	9,04343E-05	7,2662
6	0,000110047	2,5271	6	7,66027E-05	6,1548
7	8,21893E-05	1,8874	7	4,41164E-05	3,5446
8	5,47129E-05	1,2564	8	3,26871E-05	2,6263
9	4,90408E-05	1,1262	9	2,02809E-05	1,6295
10	3,26029E-05	0,74868	10	1,03641E-05	0,83273
11	2,17944E-05	0,50048	11	4,94168E-06	0,39705
12	1,39696E-05	0,32079	12	3,7419E-06	0,30065

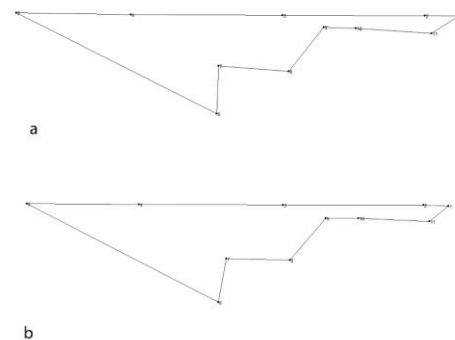
Generalized Procrustes Analysis (superimposition-GPA) was performed because of differences between the skulls in size, position and direction (Slice, 2007). PAST (Version 4.02) (Hammer et al., 2001) software was used for this analysis. Principal Component Analysis (PCA) was performed on the new coordinates obtained from the Procrustes Analysis. Thus, the degree of gender discrimination of the samples was determined by applying Covariance Analysis among the factors (Zelditch et al., 2004). In addition, MorphoJ (Klingenberg, 2011) software was used to determine the landmark levels and directions where shape differences were observed.



**Figure 3.** Graphical representation of male and female foxes according to first principal component analysis, **a.** Lateral, **b.** Dorsal.



**Figure 4.** Lateral position of the male (a) and female (b) consensus graphic



**Figure 5.** Dorsal position of the female (a) and male (b) consensus graphic.

## Results

### Lateral

The first principal component explained 73.609% of the total shape variation according to principal component analysis. Besides, from first to fifth principal components explained 91.6333% of the total shape difference (Table 1).

There was no distinctly grouping between females and males on the graphic of PCA 1. The male and female individuals mainly were gathered on the right of the y axis on the graphic (Figure 3). Statistical comparison of the landmark values was not made because the number of samples was considered insufficient.

In the relative warp analysis, RWA 1, RWA 2 and RWA 3 were found to be 59.75%, 29.44%, 10.82% in females, 95.54%, 2.04%, and 1.07% in males, respectively.

The consensus graph showed that the oral edge of the incisive tooth and the cranial edge of the canine tooth direction was ventrally in females. In addition, the direction between the cranial edge of the canine (L19) and the oral edge of the incisive tooth (L1) was cranioventral in females. This direction was parallel to the ground in males. L10 and L12 were on the same plane in females. In males, the LM12 was positioned more dorsal to the skull. The direction between L13-L12 that marked arcus zygomaticus was steeper in females than in males (Figure 4).

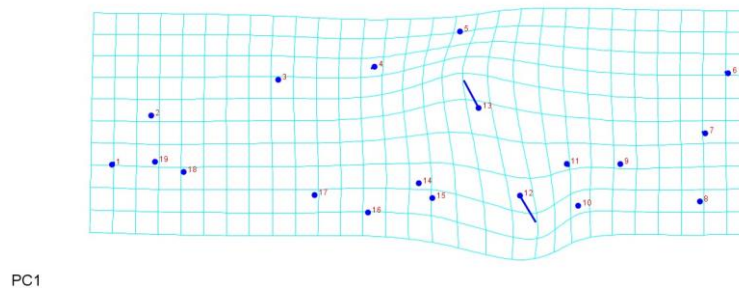
The direction of L13 was craniodorsal and L12 was caudoventral for the first principal component shown on the PC1 graph (Set scale 0.05). This change was from female to male (Figure 6).

#### Dorsal

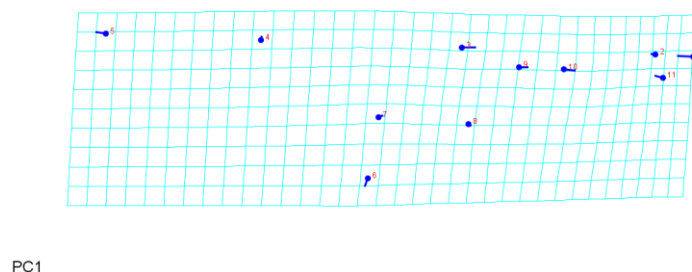
According to the principal components analysis, the first principal component explained 38,209% of the total shape variation. However, from first to fifth principal components explained 84.5142% of the total shape variation (Table 1).

No significant gender difference was observed in the PC 1 graph. It was determined that male and female individuals did not congregate in one region (Figure 3). PC 1 graph showed that the 12th individual gathered in the same region with individuals 5, 6, and 7 on the dorsal aspect. At the same time, a common gathering area was not observed with the other individuals on the lateral view (Figure 3).

The result of Relative Warp Analysis, RWA 1, RWA 2 and RWA 3 were 41.59%, 37.94%, 20.47% in



**Figure 6.** Landmark representation of shape differences of skull between male and female foxes for the first principal component on lateral figure of the skull.



**Figure 7.** Landmark representation of shape differences of skull between male and female foxes for the first principal component on dorsal figure of the skull.

females, and 43.34%, 17.37%, 13.20% in males, respectively. The consensus graph explained that no

significant difference was observed between the gender in the dorsal geometric analysis (Figure 5).

PC1 graph (Set scale 0.005) showed that the direction of L1, L5 were cranial, L3, L9, L10 were caudal, L11 was craniodorsal and L6 was cranioventral (Figure 7).

## Discussion and Conclusion

In the study, the skulls of red foxes living in Turkey were examined by the geometric morphometric methods between the gender. In literature, morphometric (Dobrowolska et al., 2018; Munkhzul et al., 2018; Onar et al., 2005; Trut et al., 1991) and geometric morphometric (Kistner et al., 2021) studies on the skulls of the foxes obtained from various regions at different times (Ancient era, the new age) are available. However, no study about the skulls of the red foxes in Turkey was analyzed by geometric morphometric method. Thus, considering that morphological structures are affected by environmental factors, this study investigates the skull shape of red foxes in Turkey. Nevertheless, this study includes some limitations in the absence of biometric data and a few materials. The skulls used in the study were obtained from foxes that died due to traffic accidents or natural causes. Therefore, the biometric data of the foxes (head-tail length, weight, etc.) could not be obtained, and a large number of materials could not be reached because the species is under protection. Since only adult fox skulls were used in the study, shape comparisons with young fox skulls could not be made.

Kistner et al. (2021) reported geometric morphometric studies using different fox skull landmarks. Accordingly, wild and farmed foxes were clearly separated, but male and female foxes did not in PC 1 graph. Similar to the literature (Kistner et al., 2021), there was no distinction of gender according to the PC 1 graph in the study.

Parsons et al. (2020) were reported a morphological study on a total of 111 red fox skulls. This study shows that the skulls of foxes living in urban and rural areas were different in shape. They (Parsons et al., 2020) stated that, habitat and gender greatly affected the shape of the skull. In addition, the gender effect was more pronounced, especially on the dorsal views of a skull in PC analysis. In our study using a limited sample and different landmarks from the literature (Parsons et al., 2020), no significant difference was observed in the geometric analysis of the dorsal aspect between the gender shown in the consensus graph.

Anatomically, female foxes have a shorter regio zygomatica and a longer squama temporalis. Therefore, the distance between the arcus zygomaticus and the os frontale is longer. Male foxes have a longer regio nasale (Parsons et al.,

2020). Many of these morphological changes may be related to the development of jaw muscles that have changed with nutrition and domestication (Adams and Rohlf, 2000; Wroe et al., 2007). A wide attachment area of the temporal muscle indicates a high bite force, and a thin zygomatic arc indicates a weak masseter muscle. Indeed, finite element modeling of bite in canids, particularly high stresses occur in the zygomatic region (Wroe et al., 2007). So that morphological variation might occur in arcus zygomaticus with jaw movement (Gürbüz et al., 2020, Milencovic et al., 2010). The changes in the zygomatic arc between male and female foxes were remarkable in the study.

Mammalian skulls are highly informative, long-term preservation structures. Therefore, geometric morphometric and traditional morphometric studies are powerful tools for biogeographic, phylogenetic, and taxonomic research, especially in the absence of molecular research (Loy, 2007). Such studies about carnivorous skulls in museums and private collections can reveal a wealth of information and adaptations of these animals (Munkhzul et al., 2018). Therefore, data obtained from archaeological bone material is essential for fauna identification, comparison with other historical processes, and estimation of morphological characteristics of animals (Clark, 1995; Onar and Belli, 2005). In conclusion, we believe that the data of this study will provide official information on the archaeological excavations.

## Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

## Ethical Approval

This study was approved by the Harran University Animal Experiments Local Ethics Committee (06.02.2020 date and 9196 Number Ethics Committee Decision). In addition, the authors declared that Research and Publication Ethical rules were followed.

## Funding

This work is not supported by any Project.

## Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 1% as stated in the report uploaded to the system.

## Author Contributions

Motivation/Concept: İG, YD, FAK, OY, İD  
 Design: İG, YD, FAK, OY, İD  
 Control/Supervision: YD  
 Data Collection and / or Processing: İG, YD, FAK, OY, İD  
 Analysis and / or Interpretation: YD, İG  
 Literature Review: İG  
 Writing the Article: İG, YD, FAK, OY, İD

## References

- Adams DC, Rohlf FJ, 2000: Ecological character displacement in *Plethodon*: biomechanical differences found from a geometric morphometric study. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 4106-4111. doi:10.1073/pnas.97.8.4106
- Animal Protection Law, 2004: Official Gazette 25509: 24.06.2004, Law no: 5199.
- Clark KM, 1995: The later prehistoric and protohistoric dog: the emergence of canine diversity. *Archaeozoologia*, 7, 9-32.
- Demiraslan Y, Özgel Ö, Gürbüz İ, Zümre Ö, 2021: The mandibles of the Honamlı and Hair goats (*Capra hircus*); a geometric morphometric study. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 68 (4), 321-328. doi: 10.33988/auvfd.759964
- Demircioğlu İ, Demiraslan Y, Gürbüz İ, Dayan MO, 2021: Geometric morphometric analysis of skull and mandible in Awassi ewe and ram. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 27 (1), 43-49, 2021. doi: 10.9775/kvfd.2020.24714
- Dobrowolska ZM, Moska M, Mucha A, Wierzbicki H, Dobrowolski M, 2018: Variation in fur farm and wild populations of the red fox, *Vulpes vulpes* (Carnivora: Canidae) - Part II: Craniometry. *Can J Anim Sci*, 98, 84-97.
- Duro S, Gündemir O, Sönmez B, Jashari T, Szara T, Pazvant G, Kambo A, 2021: A different perspective on sex dimorphism in adult Hermann's Tortoise: Geometric morphometry. *Zool Stud*, 60, 9. doi: 10.6620/ZS.2021.60.09
- Gündemir O, Özkan E, Dayan MO, Aydoğdu S, 2020a: Sexual analysis in turkey (*Meleagris gallopavo*) neurocranium using geometric morphometric methods. *Turk J Vet Anim Sci*, 44, 681-687.
- Gündemir O, Özkan E, Gezer İnce N, Pazvant G, Demircioğlu İ, Aydoğdu S, Koçyiğit A, Dayan MO, 2020b: Investigation of os coxae in horses using geometric morphometry method. *Harran Univ Vet Fak Derg*, 9(2), 170-176.
- Gürbüz İ, Aytek Aİ, Demiraslan Y, Onar V, Özgel Ö, 2020: Geometric morphometric analysis of cranium of wolf (*Canis lupus*) and German shepherd dog (*Canis lupus familiaris*). *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 26 (4), 525-532. Doi: 10.9775/kvfd.2019.23841.9775/kvfd.2
- Hammer Q, Harper DAT, Ryan PD, 2001: PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol Electron*, 4, 9.
- Higgins OP, 2000: The study of morphological variation in the hominid fossil record: biology, landmarks and geometry. *J Anat*, 197, 103-120.
- Kistner TM, Zink KD, Worthington S, Lieberman DE, 2021: Geometric morphometric investigation of craniofacial morphological change in domesticated silver foxes. *Sci Rep*, 11, 2582. Doi: 10.1038/s41598-021-82111-9
- Klingenberg CP, 2011: MorphoJ: an integrated software package for geometric Morphometrics. *Mol Ecol Resour*, 11, 353-357.
- Kruuk H, 2002: Hunter and Hunted. Relationships Between Carnivores and People. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Loy A, 2007: Morphometrics and theriology: Homage to Marco Corti. *Hystrix*, 18(2): 115-136.
- Milencovic M, Spedic VJ, Blagojevic J, Tatovic S, Vujosevic M, 2010: Skull variation in dinaric- Balkan and Carpathian gray wolf populations revealed by geometric morphometric approaches. *J Mammal*, 91(2), 376-386. Doi: 10.1644/09-MAMM-A-265.1
- Munkhzul T, Reading RP, Buuveibaatar B, Murdoch JD, 2018: Comparative Craniometric Measurements of Two Sympatric Species of *Vulpes* in Ikh Nart Nature Reserve, Mongolia. *Mong J Biol Sci*, 16(1), 19- 28.
- Onar V, Belli O, 2005: Estimation of shoulder height from long bone measurements on dogs unearthed from the Van-Yoncatepe early Iron Age necropolis in Eastern Anatolia. *Rev Med Vet*, 156, 53-60.
- Onar V, Belli O, Owen PR, 2005: Morphometric Examination of Red Fox (*Vulpes vulpes*) from the Van-Yoncatepe Necropolis in Eastern Anatolia. *Int J Morphol*, 23(3), 253-260.
- Parsons KJ, Rigg A, Conith AJ, Kitchener AC, Harris S, Zhu H, 2020: Skull morphology diverges between urban and rural populations of red foxes mirroring patterns of domestication and macroevolution. *Proc R Soc B*, 287, 20200763. Doi: 10.1098/rspb.2020.0763
- Rohlf FJ, 2017: TpsSmall Version 1.34, Ecology & Evolution. SUNY at Stone Brook, USA.
- Rohlf FJ, 2018: TpsDig Version 2.31, Ecology & Evolution. SUNY at Stone Brook, USA.
- Rohlf FJ, 2019: TpsUtil program Version 1.79, Ecology & Evolution. SUNY at Stone Brook, USA.
- Slice DE, 2007: Geometric morphometrics. *Annu Rev Anthropol*, 36, 261-281.
- Tamlin AL, Bowman J, Hackett DF, 2009: Separating wild from domestic American mink *Neovison vison* based on skull morphometrics. *Wildl Biol*, 15: 266-277. doi: 10.2981/08-004
- Trut LN, Dzershinskii FY, Nikol'skii VS, 1991: Component analysis of craniologic characters of silver foxes (*Vulpes Fulvus Desm.*) and their changes arising under domestication. *Genetika*, 27, 1440-50.
- Wozencraft WC, 2005: Carnivora. In: Mammal Species of the World, Wilson DE and Reeder D (eds), 532-628, The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Wroe S, Clausen P, McHenry C, Moreno K, Cunningham E, 2007: Computer simulation of feeding behaviour in the thylacine and dingo as a novel test for convergence and niche overlap. *Proc Biol Sci*, 274, 2819-2828. doi:10.1098/rspb.2007.0906

Yalçın H, Kaya MA, Arslan A, 2010: Comparative Geometrical Morphometries on the Mandibles of Anatolian Wild Sheep (*Ovis gmelini anatolica*) and Akkaraman Sheep (*Ovis aries*). *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 55-61.

Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD 2004: Geometric Morphometrics For Biologists: A Primer, Academic Press, Cambridge.

**\*Correspondence:** İftar GÜRBÜZ

Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Burdur, Türkiye.

**e-mail:** iftargurbuz@mehmetakif.edu.tr



## Toxocara cati ile Doğal Enfekte Kedilerde Fenbendazol+Pyrantel Pamoate ve Praziquantel Kombinasyonunun Etkinliğinin Belirlenmesi

Hakkı Seçkin ÇETİN<sup>1,a,\*</sup>, Ömür ÖZERHUN<sup>2,b</sup>, Faruk KÜÇÜKYILDIZ<sup>3,c</sup>

<sup>1</sup>Pars Veteriner Sağlık Merkezi, Ümraniye, İstanbul, Türkiye.

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi, Parazitoloji AD, İstanbul, Türkiye.

<sup>3</sup>Bursa Uludağ Üniversitesi, Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi, Görükle,,Bursa, Türkiye.

\*ORCID NO: 0000-0002-6246-3938, <sup>b</sup>ORCID NO:0000-0001-6201-9450, <sup>c</sup>ORCID NO:0000-0001-8926-5395

Geliş Tarihi: 09.11.2021

Kabul Tarihi: 27.01.2022

**Özet:** Bu çalışmada *Toxocara cati* ile doğal enfekte kedilerde fenbendazol (50 mg/kg), pyrantel pamoate (20 mg/kg) ve praziquantel (5 mg/kg) kombinasyonunun etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya dahil edilecek kedilerin belirlenebilmesi amacıyla kliniğe getirilen ve enfeksiyondan şüphelenilen hayvanlardan alınan dışkılar önce doymuş tuzlu su flotasyon yöntemiyle incelenmiştir. Daha sonra *T. cati* yönünden pozitif bulunan kedilerdeki enfeksiyon yükünü belirlemek için Mc Master yöntemi uygulanmıştır. Gram dışkıdaki yumurta sayısı (EPG) 250 ve üzeri olan toplam 10 kedi çalışmaya dahil edilmiştir. Tedavi öncesinde bu kedilerden dışkı alınarak EPG değerleri belirlenmiş ve canlı ağırlıklarına göre tablet formundaki fenbendazol+ pyrantel pamoate ve praziquantel kombinasyonu oral yolla verilmiştir. Kediler çalışma süresince klinikte ayrı bir bölmede barındırılmış ve gözlem altına alınmıştır. Tedaviden sonraki 7, 14 ve 21. günlerde bu kedilerden tekrar dışkı alınarak EPG değerleri belirlenmiştir. Tedavi edilen on kediden sekizinin dışkılarında 7, 14 ve 21. günlerde *T. cati* yumurtalarına rastlanılmamıştır. Ancak bir kedide 14 ve 21. günlerde, bir kedide de tedavi sonrasındaki her üç örnekleme gününde yapılan dışkı muayenesinde yumurtalara rastlanmıştır. Tedaviden sonraki örnekleme zamanlarının hepsinde de (7, 14, 21) ilacın etkinliği %98'in üzerinde bulunmuştur. Bununla birlikte iki kedinin dışkısında parazit yumurtalarının tespit edilmiş olması göz ardı edilmemelidir. Bu nedenle bu antihelmintik kombinasyonu yapılacak olan tedavilerinden 7-14 gün sonra dışkı muayenesi yapılarak tedavinin etkinliği gözlenmeli ve gerekirse tedavi tekrarlanmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Etkinlik, Fenbendazol, Kedi, Praziquantel, Pyrantel pamoate, *Toxocara cati*.

### Determination of the Efficacy of Fenbendazol+Pyrantel Pamoate and Praziquantel Combination in Naturally Infected Cats with *Toxocara cati*

**Abstract:** This study aimed to determine the efficacy of fenbendazole (50 mg/kg), pyrantel pamoate (20 mg/kg), and praziquantel (5 mg/kg) combination in cats which naturally infected with *Toxocara cati*. The feces taken from animals brought to the clinic and suspected of infection were examined by the saltwater flotation method. Then, the Mc Master method was applied to determine the infection burden in cats positive for *T. cati*. Ten cats with 250 or more eggs per gram stool (EPG) were included in the study. Before the treatment, feces were taken from these cats. EPG values were determined. The combination of fenbendazole + pyrantel pamoate and praziquantel in tablet form was given orally. The cats were housed in a separate compartment in the clinic and kept under observation during the study. On the 7th, 14th, and 21st days after the treatment, feces were retaken from these cats, and EPG values were determined. No *T. cati* eggs were found in the feces of eight of ten treated cats on days 7, 14, and 21. However, eggs were found in the stool examination performed on the 14th and 21st days in one cat and every three sampling days after the treatment in one cat. The drug's effectiveness was found to be over 98% in all sampling times after treatment (7, 14, 21). However, the detection of parasite eggs in the feces of two cats should not be ignored. For this reason, 7-14 days after the treatment with this anthelmintic combination, a fecal examination should be performed to observe the effectiveness of the treatment. If necessary, the treatment should be repeated.

**Keywords:** Cat, Efficacy, Fenbendazole, Praziquantel, Pyrantel pamoate, *Toxocara cati*.

### Giriş

Kedilerde oldukça yaygın olan intestinal helmintler kolay bulaşabilmeleri ve direkt gelişmeleri nedeniyle dünyanın hemen her bölgesinde görülebilmektedir. Bu nedenle de en fazla dikkat çeken ve üzerinde en çok çalışma yapılan helmint grubunu oluşturmaktadır. *Toxocara cati*'de kedilerde en sık karşılaşılan ve problem oluşturan nematodlardan biridir (Fisher, 2003; Sauda etal, 2019). Morfolojik

olarak oldukça büyük yapıda olan *T. cati* kedilerin dışkıları ile atıldığında çıplak gözle görülebilmekte ve bunu fark eden hayvan sahiplerinde endişeye neden olmaktadır. *T. cati* ile hafif ya da orta derecede enfekte olan kedilerde genellikle ağır bir klinik tablo şekillenmemekle birlikte ishal, karında şişlik, gelişim geriliği, tüylerde karışıklık ve kirli görünüm, bazen de kusma gibi belirtiler

**Tablo 1:** Çalışma grubunu oluşturan kedilerde tedavi öncesi ve sonrasında gram dışındaki *T. cati* yumurta sayıları (EPG).

Kedi No	Tedavi öncesi EPG	Tedavi sonrası EPG		
	0.gün	7.gün	14.gün	21.gün
1	41,300	-	-	-
2	3000	-	-	-
3	800	-	-	-
4	900	-	400	800
5	250	-	-	-
6	400	700	100	200
7	2700	-	-	-
8	500	-	-	-
9	1100	-	-	-
10	300	-	-	-
<b>Ort.</b>	5125	70	50	100
<b>Etki oranı</b>		%98,63	%99,02	%98,04

görülebilmektedir (Knaus ve ark., 2014). Ayrıca larvaların hepato-trakeal göçleri sonucu öküürük, abdominal solunum ve alt solunum yolu problemleri ortaya çıkabilmektedir. Ağır enfeksiyonlarda ise bağırsak tıkanması, perforasyonlar, sinirsel belirtiler ortaya çıkabilmekte hatta ölümler şekillenebilmektedir. Kediler; galaktojen yolla, yumurtaların oral yoldan alınmasıyla ya da paratenik ara konakların yenilmesi suretiyle enfeksiyona yakalanmaktadır (Knaus ve ark., 2014, Lee ve ark., 2010). Günümüzde hem hekimler hem de hasta sahipleri tarafından yüksek etkili antelmentiklere kolayca ulaşılabilmesine rağmen gastrointestinal helmintler kedilerde tüm dünyada hala büyük problem oluşturmakta ve zoonoz potansiyelleri nedeniyle halk sağlığını yakından ilgilendirmektedirler (Bakhshani ve ark., 2019; Catton ve ark., 2003; Fisher, 2003; Lee ve ark., 2010). *T. cati* de dünyanın birçok ülke ve bölgesinde insanlarda enfeksiyonlar oluşturarak visceral larva göçüne neden olabilmektedir. İnsanlar bu parazitin yumurtalarını bulaşık olan su ve çeşitli gıdalarla alarak enfeksiyona yakalanmaktadır. Ayrıca kedilerin tüylerine yapışmış olan yumurtaların kedi ile temastan sonra veya bu yumurtalarla bulaşık olan toprak ile temastan sonra ellerin iyice yıkanmadan ağza götürülmesiyle de enfeksiyonlar şekillenebilmektedir (Bakhshani ve ark., 2019; Öge ve ark., 2014). Bu nedenlerden dolayı gerek kedilerin sağlığını ciddi olarak etkileyen gerekse halk sağlığını tehdit eden *T. cati* enfeksiyonlarının kedilerde ortaya konulması ve uygun bir antelmentik ile tedavi edilmesi büyük bir önem taşımaktadır. *T. cati* ve diğer ascaridlerin tedavisi amacıyla benzimidazol, imidazotiyazol türevleri, tetrahidropirimidin türevleri, piperazin türevleri, avermektinler, siklootadepsipeptidler gibi çeşitli sınıflardan birçok antelmentik kullanılabilmektedir.

Bu antelmentikler tek ya da kombine halde enjektabl, spot-on ve tablet gibi farklı formlarda uygulanmaktadır (Riviere ve Papich, 2009). Tablet ve enjektabl ürünler uzun yıllardır sahada kullanılmasına rağmen günümüzde giderek yaygınlaşan spot-on ilaçlar hem hekimler hem de hasta sahipleri tarafından uygulama kolaylığı ve geniş etki spektrumu sayesinde daha çok tercih edilir hale gelmiştir (Knaus ve ark., 2014; Lee ve ark., 2019; Tüzer ve ark., 2010). Ancak *T. cati* enfeksiyonlarının tedavisi amacıyla pratikte kullanılan çok farklı etken maddeler bulunmasına rağmen bunların etkinlik düzeylerini ortaya koyan çalışma sayısı kısıtlıdır (Altreuther ve ark., 2005; Knaus ve ark., 2021; Vatta ve ark., 2019). Türkiye’de ise kedi helmintleri üzerinde yapılmış tedavi denemeleri oldukça sınırlı düzeydedir (Tüzer ve ark., 2010). Yaptığımız literatür taramalarında sahada kullanılan antelmentiklerin tek tür ile olan enfeksiyon olarak *T. cati* üzerindeki etkinliklerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiş bir çalışmaya rastlayamadık. Bu çalışmada 15 yıldan fazla bir süreden beri ülkemizde kedi ve köpeklerdeki gastrointestinal nematodların ve cestodların tedavisi amacıyla kullanılan fenbendazol + pyrantel pamoate + praziquantel kombinasyonunun *T. cati* ile doğal enfekte kedilerde etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Çalışma Alanı:** Çalışma İstanbul’un Avrupa yakasında faaliyet gösteren özel bir kliniğe getirilen *T. cati* ile enfekte sahipli ve sahihsiz kedilerde gerçekleştirilmiştir. Çalışma 15 Ocak 2020- 15 Nisan 2020 tarihleri arasında 3 aylık bir zaman diliminde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda kliniğimize getirilen sahipli ve sahihsiz hasta hayvanlara sadece

antiparaziter tedavi uygulanmış ve iyileşme süreçleri dışkı muayeneleri ile takip edilmiştir. Dolayısı ile hayvanlara acı ve ıstırap verici herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Ayrıca etik Kurulu ile yaptığımız görüşmede başvuruya gerek olmadığı ifade edilmiştir. Diğer taraftan bu ve benzeri çalışmalarda Etik Kurul İzin Belgesi gerekmediği 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 nolu Resmî Gazetede yayınlanan "Hayvan Deneyleti Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin İkinci Bölümünün (Deney Hayvanının Kullanılma Amaçları, Etik Kurulların Kuruluş, Görev Süresi, Çalışma Yöntemi, Görev ve Yetkileri) 8. Maddesinin k (1,4) bendinde açıkça belirtilmiştir.

**Kediler ve Barınma:** İstanbul'un Avrupa yakasındaki çeşitli bölgelerden kliniğe getirilen ve gastrointestinal helmintlerden şüphelenilen toplam 90'a yakın kediden dışkı örnekleri alınarak *T. cati* yumurtaları yönünden incelenmiş ve pozitif bulunan 10 kedi çalışmaya dahil edilmiştir. Yaşları 2,5 ay ile 2 yıl arasında değişen kedilerden 6'sı dişi 4'ü erkektir. Çalışma grubundaki sahipli kedilerde etkene yönelik ve spesifik olmayan düzensiz tedavilerin yapıldığı tespit edilmiştir. Sahipsiz olan kedilerin daha önce antelmentik tedavisi alıp almadıklarını tespit edebilmemiz mümkün olmamakla birlikte, kedilerin genel görünüşleri ve enfekte olmaları nedeniyle herhangi bir tedavi yapılmadığı değerlendirilmiştir. Dışkısında *T. cati* yumurtaları tespit edilen toplam 10 kedi çalışmaya dahil edilmiştir. Bu kediler ayrı ayrı bölümlere alınarak çalışma süresince klinikte barındırılmış, bakım ve beslemesi yapılmıştır.

**Gruplandırma:** Çalışmada; enfekte hayvan sayısının yetersizliği nedeniyle sadece tedavi grubu kullanılmıştır. Kontrol grubu oluşturulmamış olup, tedavi öncesindeki ve tedavi sonrasındaki EPG değerleri karşılaştırılmıştır.

**Dışkı Örneklerinin Alınması ve Laboratuvar Muayeneleri:** Kliniğe getirilen kedilerin enfekte olup olmadıklarını belirleyebilmek amacıyla şüpheli olan hayvanlardan dışkı alınmıştır. Tüm dışkılar plastik kaplara konulmuş ve üzerine kedinin yaşı, ırkı, cinsiyeti gibi bilgiler not edilmiştir. Alınan örnekler buzdolabında inceleneceği zamana +4 °C'de kadar muhafaza edilmiştir. Şüpheli kedilerden alınan dışkı örnekleri öncelikle doymuş tuzlu su flotasyon yöntemiyle ışık mikroskopunda incelenerek enfekte olup olmadıkları belirlenmiştir. Daha sonra pozitif bulunan kedilerde enfeksiyon yükünü saptamak amacıyla Mc Master yöntemi uygulanmıştır. Gram dışkıdaki yumurta sayısı (EPG) 250≥ olan toplam 10 kedi çalışmaya alınmıştır.

**Tedavi:** Çalışmaya dahil edilen kedilerden 0. günde dışkı alınarak antelmentik uygulanmıştır. Bu amaçla önce kediler hassas bir şekilde tartılmış ve ağırlıkları kaydedilmiştir. Daha sonra antelmentik prospektüsünde önerildiği şekilde (fenbendazol 50

mg/kg, pyrantel pamoate 20 mg/kg, ve praziquantel 5 mg/kg dozda) oral yolla verilmiştir. Uygulamalar genel etik kurallar ve hayvan refahı çerçevesinde, hayvanlara acı ve ıstırap verilmeden rutin tedavi prosedürlerine göre yapılmıştır. Kedilere ilaç verildikten sonra bireysel bölmelere alınmış ve 24 saat süreyle gözlenmiştir.

**Antelmentik Etkinliğin Belirlenmesi:** Tedavi sonrasındaki 7,14 ve 21. günlerde her bir kedinin gram dışkısındaki *T. cati* yumurta sayısı (EPG) belirlenerek grup ortalaması alınmıştır. Kullanılan antelmentik kombinasyonunun tedavi sonrası örnekleme yapılan günlerdeki etkinliği aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Cabaret ve Berrag, 2004).

$$\text{FECR (\%)} = 100 \times [1 - (\text{T2}/\text{T1})]$$

**FECR:** Dışkıda yumurta azalma oranı

**T1:** Tedavi öncesi ortalama EPG

**T2:** Tedavi sonrası ortalama EPG

## Bulgular

Çalışmada yer alan kedilerin tedavi öncesi ve sonrasında (7, 14 ve 21. günlerde) yapılan dışkı muayenelerinde gram dışkıda saptanan *T. cati* yumurta sayıları (EPG) Tablo 1' de verilmiştir. Bu tablonun incelenmesinden de anlaşılacağı gibi 7. günde yapılan dışkı muayenelerinde kedilerden 9 tanesinin dışkısında hiçbir parazit yumurtasına rastlanmamıştır. Bir kedide ise yumurta sayısında önemli düzeyde (%75) artış tespit edilmiştir. Tedaviden sonraki 14 ve 21. günlerde ise ikişer kedinin dışkısında yumurta tespit edilmiştir.

Tedavi öncesinde ortalama EPG 5.125 iken, tedaviden sonraki 7. günde 70, 14. günde 50, 21. günde ise 100 olarak tespit edilmiştir. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası ortalama EPG değerleri karşılaştırıldığında kullanılan antelmentik kombinasyonunun 7, 14 ve 21. günlerdeki etki oranları sırasıyla %98.63, %99.02 ve %98.04 olarak belirlenmiştir.

## Tartışma ve Sonuç

Türkiye'de son yıllarda kedi ve köpeklere daha fazla ilgi gösterilmesi nedeniyle bu hayvanların sayıları önemli oranda artmıştır. Bununla bağlantılı olarak bu hayvanların sağlıklarını korumaya yönelik piyasaya sunulan ürün yelpazesi de genişlemiştir. Kedi ve köpeklerin sağlıklarını olumsuz yönde etkileyen parazitlere karşı kullanılmak üzere birçok antelmentik yerli ve yabancı ilaç firmaları tarafından ticari olarak satışa sunulmuştur. Bu amaçla

fenbendazol, febantel, pyrantel pamoate, emodepsid ve praziquantel gibi etken maddeler tek başına veya ikili ve üçlü kombinasyonlar şeklinde kullanılmaktadır. Ancak bu antelmentikler kedi ve köpeklerde sıkça kullanılmasına rağmen bunların etkinliklerinin belirlenmesine yönelik olarak yapılmış çalışma sayısı oldukça kısıtlı düzeydedir (Sarımehmetoğlu ve ark., 2002; Yıldız ve ark., 1997). Özellikle kedilerde yapılmış olan çalışma sayısı ise çok daha azdır (Tüzer ve ark., 2010). Yaptığımız literatür taramalarında Türkiye’de sadece *T. cati* (tek tür ile enfeksiyon) üzerinde antelmentik etkinliğin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiş olan bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu nedenle bu çalışmada ülkemizde pet sektöründe veteriner hekimlerin uzun zamandan beri kullanılmakta olduğu fenbendazol + pyrantel pamoate + praziquantel kombinasyonunun kedilerdeki doğal *T. cati* enfeksiyonlarındaki etkinliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan antelmentik kombinasyonunun içerisindeki etken maddelerden birisi olan pyrantel pamoate evcil hayvanlardaki nematodlara karşı oldukça yüksek etki gösteren bir tetrahidropirimidin bileşimidir. Uzun yıllardır piyasada mevcut olan bu etken maddenin pomat formu özellikle kedi ve köpeklerde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Gennari ve ark., 1997). Reinemeier ve DeNovo (1990) tarafından yapılan çalışmada pyrantel pamoate 20 mg/kg dozunda pasta ve granül tarzında verilmek suretiyle kedilerdeki *T. cati* ve *Ancylostoma tubaeforme* enfeksiyonları üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Araştırmacılar (Reinemeier ve DeNovo, 1990) pyrantel pamoate pasta formunda verildiğinde kedilerde *T. cati* yumurta sayısında %96,4 oranında azalma sağladığını, granül olarak verildiğinde ise ilacın daha az etki gösterdiğini (%78,2) belirlemişlerdir. Kontrol grubunun kullanıldığı benzer bir çalışmada ise (Ridley ve ark., 1991) pyrantel pamoate 20 mg/kg dozunda pasta ve granül formunda uygulanmış ve çalışma sonunda kedilere nekropsi yapılarak mevcut parazitler toplanmıştır. İlacın etkinliğinin hem dışkıda yumurta sayısı azalma oranına göre (FECRT) hem de nekropsi sonucunda elde edilen parazit sayılarının karşılaştırılmasıyla belirlendiği bu çalışmada pyrantel pamoate pasta formülasyonu *Toxocara sp.* yumurta sayısında %99,7, granül formülasyonu ise %99,9 oranında bir azalma sağladığı ortaya konulmuştur (Ridley ve ark., 1991). Nekropsi sonuçlarına göre ise hem pasta hem de granül formülasyonu %100 etkili bulunmuştur. Bizim çalışmamıza benzer bir şekilde üç etken maddeli (pyrantel pamoate+oxantel pomat+praziquantel) bir antelmentik kombinasyonu kedilerde üç farklı dozda kullanılarak *T.cati* ve diğer bazı helmintlere karşı etkinlik düzeyi belirlenmiştir (Gennari ve ark.,1997). Gennari ve ark. (1997)

tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada pyrantel pamoate ve oxantel pomat 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarında uygulanmış olup *T. cati* üzerindeki etki düzeyi sırasıyla %93, %96,7 ve %100 olarak tespit edilmiştir. Kedilerde *T. cati* üzerine fenbendazolün etkinliğini belirlemek amacıyla yapılmış çalışma sayısı oldukça sınırlıdır (Roberson ve Burke, 1980). Roberson ve Burke (1980) 50 mg/kg dozunda 3 gün arka arkaya kullandığı fenbendazolün kedilerdeki *T. cati* enfeksiyonlarında %100 etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Bildiğimiz kadarıyla Türkiye’de pyrantel pamoate ya da fenbendazolün kedilerde *T.cati* enfeksiyonları üzerindeki etkinliğini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmadaki antelmentik kombinasyonuna benzeyen bir kombinasyon köpeklerde helmint enfeksiyonlarına karşı denenmiş olup pyrantel pamoate içeren bu preparatın ascaritler üzerinde %71,5 etkili olduğu ortaya konulmuştur (Yıldız ve ark., 1997). Toplam 10 kedi kullanılarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada tedavi öncesindeki ortalama *T. cati* yumurta sayıları ile tedavi sonrasında 7, 14 ve 21. günlerdeki ortalama yumurta sayıları karşılaştırılarak kullanılan antelmentik kombinasyonunun etkinlik düzeyi belirlenmiştir. Çalışmada fenbendazol+ pyrantel pamoate +praziquantel kombinasyonunun *T. cati* yumurta sayısında 7, 14 ve 21. günlerde sırasıyla %98.63, %99.02 ve %98.04 oranlarında azalma sağladığı tespit edilmiştir. Tedavi sonrasındaki 7. günde bir kedinin, 14 ve 21. günlerde ise ikişer kedinin (tricolor, 7 aylık, dişi kedi, 2,6 kg ve tekir, 2 yaşında, dişi kedi, 3,5 kg) dışkısında *T. cati* yumurtalarına rastlanılmıştır. Hatta tedaviden sonraki 7. günde pozitif bulunan kedinin dışkısında EPG değeri tedavi öncesi değere göre önemli oranda (%75) artış göstermiştir. Tedaviden sonra dışkılarında *T. cati* yumurtalarına rastlanılan bu kedilerde kullanılan antelmentik’in etkisiyle dişi parazitlerin parçalanarak fazla miktarda yumurtanın dışkıya karışması nedeniyle böyle bir durumun şekillendiğini düşünmekteyiz. Diğer taraftan tedaviden sonra pozitif bulunan bu kedilerde gastrointestinal bir bozukluk şekillenmiş, dolayısıyla da ilaç yeteri düzeyde emilmemiş de olabilir. Fenbendazol’ün tek mideli hayvanlarda ve ruminantlarda güvenlik indeksinin oldukça yüksek olduğu ve bu hayvanların oldukça yüksek dozları tolere edebildiği bildirilmektedir (Schwartz ve ark., 2000). Pyrantel pamoate oldukça güvenli bir antelmentik olup normal dozun (20 mg/kg) beş katına kadar ilaç uygulanan kedilerde herhangi bir yan etkinin görülmediği bildirilmiştir (Reinemeier ve DeNovo, 1990). Schwartz ve ark. (2000) ile Reinemeier ve DeNovo (1990)’nun bulgularına benzer şekilde pyrantel pamoate’ı 20 mg/kg, fenbendazolü 50 mg/kg dozunda uyguladığımız bu

çalışmada da ilaç verilen kedilerde herhangi bir yan etki veya olumsuzluk gözlenmemiştir.

Etik kurallar, hayvan hakları ve refahı açısından bu çalışmada nekropsi gerçekleştirilememiş olup kullanılan antelmentik kombinasyonun etkisi dışında yumurta sayısı azalma testine göre (FECRT) hesaplanmıştır. Nekropsi yapılamadığı için bağırsaklar incelenememiş ve tedaviye rağmen dışkıda parazit yumurtasına rastlanan kedilerde bunun nedeni saptanamamıştır. Ayrıca ilaç sadece erkek parazitleri öldürmüş ve dişilerin yumurtlama kabiliyetlerini azaltmış olabilir. Çalışmada 14. ve 21. günlerde ilaç verilmesine rağmen parazit yumurtası bulunan kediler sokak kedisi olduğu için daha fazla parazit yüküne sahip olabilir. Bu yüzden ilaç verilmesinden sonraki zamanlarda da rutin dışkı muayenelerine devam edilmelidir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda fenbendazol+ pyrantel pamoate ve praziquantel kombinasyonunun kedilerde *T. cati*'ye %98'in üzerinde etkili olduğu ortaya konulmuştur. Bununla birlikte tedavi sonrasında örneklem günlerinde iki kedinin dışkılarında *T. cati* yumurtalarının tespit edilmiş olması gözden kaçırılmamalıdır. Bu durumu dikkate alarak bu antelmentik kombinasyonu ile yapılacak olan tedavilerden 7-14 gün sonra kedilerden dışkı örnekleri alınarak muayene edilmesini böylece tedavinin etkinliğinin gözlenmesini ve gerekirse tedavinin tekrar edilmesini önermekteyiz.

### Teşekkür

Bu çalışmada desteklerini bizlerden esirgemeyen PARS VETERİNER SAĞLIK MERKEZİ çalışanlarına teşekkürlerimizi sunarız.

### Çıkar çatışması

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

### Etik izin

Çalışmamızda kliniğimize getirilen sahipli ve sahipsiz hasta hayvanlara sadece antiparaziter tedavi uygulanmış ve iyileşme süreçleri dışkı muayeneleri ile takip edilmiştir. Dolayısı ile hayvanlara acı ve ızdırap verici herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Ayrıca etik Kurulu ile yaptığımız görüşmede başvuruya gerek olmadığı ifade edilmiştir. Diğer taraftan bu ve benzeri çalışmalarda Etik Kurul İzin Belgesi gerekmediği 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 nolu Resmi Gazetede yayınlanan "Hayvan Deneyleti Etik Kurullarının

Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin İkinci Bölümünün (Deney Hayvanının Kullanılma Amaçları, Etik Kurulların Kuruluş, Görev Süresi, Çalışma Yöntemi, Görev ve Yetkileri) 8. Maddesinin k (1,4) bendinde açıkça belirtilmiştir.

### Finansal destek

Bu çalışma herhangi bir finansal proje ile desteklenmemiştir.

### Benzerlik Oranı

Makalenin benzerlik oranının sisteme yüklenen raporda belirtildiği gibi %1 olduğunu beyan ederiz.

### Açıklama

Bu çalışma Türkiye'de daha önce fenbendazol+pyrantel pomat ve praziquantel kombinasyonunun kedilerde *T. Cati* enfeksiyonları üzerinde etkinliğine dair bir çalışma bulunmamasına binaen düzenlenmiş ve bilim dünyasına sunulmuştur.

### Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: HŞÇ  
Tasarım: HŞÇ  
Denetleme/Danışmanlık: FK  
Veri Toplama ve/veya İşleme: HŞÇ  
Analiz ve/veya Yorum: FK  
Kaynak Taraması: ÖÖ  
Makalenin Yazımı: HŞÇ  
Eleştirel İnceleme: Ömür Özerhun

### Kaynaklar

- Altreuther G, Buch J, Charles SD, Davis WL, Krieger KJ, Radeloff I, 2005: Field evaluation of the efficacy and safety of emodepside/ praziquantel spot-on solution against naturally acquired nematode and cestode infections in domestic cats. *Parasitol Res*, 97: 58-64.
- Bakhshani A, Maleki M, Haghparast A, Shirvan SP, Borji H, 2019: A survey on *Toxocara cati* eggs on the hair of stray cats: A potential risk factor for human toxocarasis in Northeastern Iran. *Comp Immunol Microb*, 64, 10-13.
- Cabaret J, Berrag B, 2004: Faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy: average versus individually based estimations. *Vet Parasitol*, 121, 105-113.
- Catton DG, Van Schalkwyk PC, 2003: The efficacy of two anthelmintics against ascarids and hookworms in naturally infected cats. *Parasitol Res*, 90, 144-145.
- Fisher M, 2003: *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends in Parasitology*, 19 (4), 167-170.



- Gennari SM, Kasai N, Nishi SM, Pena HFJ, 1997: Anthelmintic efficacy of three doses of an association of pyrantel pamoate plus oxantel pamoate and praziquantel in naturally infected cats. *Braz J vet Res Anim Sci, São Paulo*, 34, 5, 284-287.
- Knaus M, Baker CF, Reinemeyer CR, Chester ST, Rosentel J, Rehbein S, 2014: Efficacy of a novel combination of fipronil, (S)-methoprene, eprinomectin and praziquantel against adult and larval stages of *Toxocara cati* in cats. *Vet Parasitol*, 202, 34–39.
- Knaus M, Baker C, Alva R, Mitchell E, Irwin J, Shukullari E, Veliu A, Ibarra-Velarde F, Liebenberg J, Reinemeyer C, Tielemans E, Wakeland K, Johnson C, 2021: Efficacy of a novel topical combination of esafoxolaner, eprinomectin and praziquantel in cats against *Toxocara cati* and *Dipylidium caninum*. *Parasite*, 28, 28.
- Lee SH, Ock Y, Choi D, Kwak D, 2019: Gastrointestinal parasite infection in cats in daegu, republic of korea and efficacy of treatment using topical emodepside/praziquantel formulation. *Korean J Parasitol*, 57, (3), 243-248.
- Lee ACY, Schantz PM, Kazacos KR, Montgomery SP, Bowman DD, 2010: Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. *Trends Parasitol*, 26 (4), 155-161.
- Öge H, Öge S, Özbakış G, Gürcan S, 2014: Comparison of *Toxocara* eggs in hair and faecal samples from owned dogs and cats collected in Ankara, Turkey. *Vet Parasitol*, 206, 227–231.
- Riviere, JE, Papic MG, 2009: Veterinary pharmacology & therapeutics. Ninth ed. Wiley Blackwell, Iowa, USA. pp.1524.
- Reinemeyer CR, De Novo RC, 1990: Evaluation of the efficacy and safety of two formulations of pyrantel pamoate in cats. *Am J Vet Res*, 51, 6, 932-4.
- Ridley RK, Terhune KS, Granstrom DE, 1991: The efficacy of pyrantel pamoate against ascarids and hookworms in cats. *Vet Res Commun*, 15, 1, 37-44.
- Roberson EL, Burke TM, 1980: Evaluation of granulated fenbendazole (22.2%) against induced and naturally occurring helminth infections in cats. *Am J Vet Res*, 41: 1499–1502.
- Schwartz, RD, Donoghue AR, Baggs RB, Clark T, Partington C, 2000: Evaluation of the safety of fenbendazole in cats. *Am J Vet Res*, 61 (3): 330-332.
- Sauda F, Malandrucchio L, De Liberato C, Perrucci S, 2019: Gastrointestinal parasites in shelter cats of central Italy. *Vet Parasitol Reg Stud Rep*, 18, 100321.
- Sarımehtemtoğlu HE, Gönenc B, Adanır R, Kozan E, 2002: The effect of nitroscete on ascarid and *D.caninum* infections in dogs. *Türk J Vet Anim Sci*, 26: 341-343.
- Toxocara cati* in cats presented as veterinary patients in the United States. *Vet Parasitol*, 270: 45–51.
- Tüzer E, Bilgin Z, Öter K, Erçin S, Tınar R, 2010: Praziquantel enjeksiyonluk çözeltinin kedi ve köpek sestodlarına etkisi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 34, (1), 17-20.
- Vatta AF, Myers MR, Bowman DD, Rugg JJ, Damrah L, Therrien C, Liotta JL, Forster AL, King VL, Rugg D, 2019: Efficacy and safety of a new topical formulation of selamectin plus sarolaner in the treatment and control of natural infections of *Ancylostoma tubaeforme* and *Toxocara cati* in cats presented as veterinary patients in the United States, *Vet Parasitol*, 270: 45–51.
- Yıldız K, Gıcık Y, Başsatan A, 1997: Köpeklerde bazı sestod ve nematodlara paratak plus etkisi. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 44, 1-4.

\*Yazışma Adresi: Hakkı Seçkin ÇETİN

Pars Veteriner Sağlık Merkezi, Mehmet Akif Mah. Aziz Bulvarı. No:13/B ÜMRANİYE/İSTANBUL.

e-mail:hseckincetin@gmail.com

## Histological Structure of the Plastinated Kidney Following Deplastination

Saime Betül BAYGELDİ<sup>1,a</sup>, Uğur ŞEKER<sup>2,b</sup>, Barış Can GÜZEL<sup>1,c,\*</sup>

<sup>1</sup>Fırat University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Elazığ, Turkey.

<sup>2</sup>Dicle University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Diyarbakır, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID:0000-0002-4403-8663, <sup>b</sup>ORCID:0000-0002-1693-6378, <sup>c</sup>ORCID:0000-0002-2504-120X.

Geliş Tarihi: 14.11.2021

Kabul Tarihi: 28.02.2022

**Abstract:** Plastination is a laboratory process to obtain permanent dry tissue and organ sample. That can be used in the future for investigation and educational purposes. This methodology is based on dehydration and penetration of synthetic substances such as silicon into tissue. In this study, it was aimed to deplastinate previously plastinated kidneys in order to examine them under the light microscope. In this study, 14 sheep kidneys were used, seven samples of control and seven samples of plastination-deplastination (p / d) group. Kidneys in both control and p/d groups were fixed in 10% formalin. The samples in the control group were embedded in paraffin following routine tissue processing protocol. However, the samples in the p/d group were deplastinated in alcohol and methylbenzene and embedded into paraffin. 5 µm thick sections obtained from paraffin blocks were stained with hematoxylin and eosin (H&E), periodic acid-schiff (PAS) and then examined under the light microscope. Typical histological structures were observed in the control group. Small fragments were obtained as it was challenging to obtain sections from the P/d group blocks. Morphological structures were visible with some pseudo degenerations and wrong staining. This study is the first study that demonstrates alcohol and methylbenzene deplastination can be partially successful for evaluating plastinated kidney samples under a light microscope. However, we believe that the kidney may have limitations due to its wide parenchyma compared with literature conclusions. Nevertheless, more studies are required to develop the optimum protocols.

**Keywords:** Histology, Kidney, Plastination, Sheep, Veterinary anatomy.

### Deplastinasyon Sonrası Plastine Böbreğin Histolojik Yapısı

**Özet:** Plastinasyon, gelecekte araştırma ve eğitim amaçlı kullanılacak kalıcı kuru doku ve organ örnekleri elde etmeye yönelik bir laboratuvar işlemidir. Kısaca bu metodoloji silikon gibi sentetik maddelerin dehidrasyona ve dokuya nüfuz etmesine dayanmaktadır. Bu çalışmada ışık mikroskobu altında incelemek için önceden plastine edilmiş böbrekleri deplastine etmeyi amaçladık. Bu çalışmada 7 örnek kontrol ve 7 örnek plastinasyon-deplastinasyon (p/d) grubu olmak üzere, 14 koyun böbreği kullanıldı. Hem kontrol hem de p/d gruplarındaki böbrekler %10 formalin içinde sabitlendi. Kontrol grubundaki örnekler rutin doku işleme protokolü izlenerek parafine gömüldü, ancak p/d grubundaki örnekler alkol ve metil benzen içinde deplastine edildikten sonra parafine gömüldü. Parafin bloklarından elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler Hematoksilen ve eozin (H&E) ile boyanarak ardından periyodik asit-schiff (PAS) ile ışık mikroskobu altında incelendi. Kontrol grubunda normal histolojik yapılar gözlemlendi. P/d grup bloklarından kesitler elde etmek zor olduğu için küçük parçalar elde edildi. Morfolojik yapılarda bazı dejenarasyonlar gözlemlendi. Bu, plastine böbrek örneklerinin alkol ve metil benzen ile deplastinasyonunun ışık mikroskobu altında değerlendirilmesinde kısmen başarılı olabileceğini gösteren ilk çalışmadır. Ancak literatürdeki sonuçlarla karşılaştırıldığında böbreğin geniş parankiminden dolayı bazı kısıtlılıklarının olabileceğini düşünmekteyiz, ancak optimum protokollerini geliştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Böbrek, Histoloji, Koyun, Plastinasyon, Veteriner anatomi. ,

### Introduction

Preservation of the body or tissue of the dead has taken humankind's attention from the very beginning of human history. Instinctively, throughout history, humankind aimed to find a way to embalm the remains of dead human and animal species. During the ancient Egyptian period, humankind used organic chemicals to preserve the dead body, but organic treatment during this process is obscure as there are no remaining records (Buckley et al., 2001). Even embalmed paleoparasitological remains were found in embalming rejects jars in Egypt in recent history

(Bouchet et al., 2003). Nowadays, tissue and cell preservation are widely used in medicine and animal-related sciences to preserve cells or the total body of species for education, examination, and even medical use. For example, animal taxidermy is widely used to preserve the remains of the dead, mainly the skin of the dead animals.

In medicine, liquid nitrogen is widely used as a preservative to store and keep cells alive before medical treatments such as chemotherapy which affect fertility. Liquid nitrogen can be used in cell culture-related studies as well. Also, formaldehyde

is still one of the most used preservative chemicals for educational purposes, mainly in morphology-related lessons. However, long-term formaldehyde storage may lead to problems in tissue preservation, processing, and staining protocols for histological examinations (Rhodes, 2013). In recent years, it was also reported that formaldehyde might cause health problems such as upper respiratory and tract problems, even nasopharyngeal cancer, and leukemia (Lan et al., 2015; Zendejdel et al., 2016). If self-care instruments are not used, formaldehyde may also lead to eye and skin irritation. Because of the toxic properties of formaldehyde, the development or exploration of a safer tissue preservative method has been a title of discussion between morphologists for a long time. In 1977, Dr. Gunther von Hagens (1986) developed plastination, an organ or body preservation method. In this methodology, lipid and water of tissue are replaced with curable polymer chemicals such as epoxy, polyester, or silicone, and the plastinated tissues have natural-looking, but dry, odorless, durable, and harden, and requires minimum care during storage (Al-Ali et al., 2009; Bolintineanu et al., 2017; Steinke et al., 2008; Van Hagens, 1986). Compared to formaldehyde, the safer property of plastination may allow this methodology to be replaced with formaldehyde preservation mainly in anatomy laboratories, which can be applied to all soft tissue types (O'sullivan and Mitchell, 1995). On the other hand, deplastination is the opposite process of plastination, believing that the samples can be returned to their natural form. Thus, deplastination will allow the samples to be used in various examinations after long preservation at room temperature (Ravi and Bhat, 2011).

Studies aiming to find a way to examine plastinated materials under a light microscope are a very new-born research title, and these studies based on this research area are minimal. Besides all soft tissues appropriate for plastination, one of the most examined organs in this preservation methodology is the kidney (Pereira-Sampaia et al., 2011). Kidneys are bean-shaped organs located at the posterior part of the abdominal cavity, next to the columnae vertebrales. Functionally, the kidney is an organ that takes functions during the dischargement of filtrated waste material from the blood. Waste materials in the blood are filtered via the functional parenchyma of kidneys, the nephrons, and urine then discharged (Rouiller, 2014).

Even though there are limited data for deplastination of kidneys, this study aimed to investigate morphological structures in deplastinated kidneys following plastination.

Furthermore, determine whether alcohol and methylbenzene deplastination are suitable for sheep kidneys for microscopic examination or not.

## Materials and Methods

**Study design:** This study was performed with the permission of the Experimental Animals Local Ethics Committee in Dicle University with a 35582840-604-02 approval number. In this study, 14 freshly collected sheep kidneys from slaughterhouses were used, and the organ samples were randomly divided into control and plastination-deplastination (d/p) groups of seven samples in each. The volumes of the kidneys were measured with a caliper, and data were collected for statistical evaluation. For further laboratory steps, the control and d/p samples were fixed in 10% formaldehyde. Samples in the control group were subjected to routine histological tissue processing protocol, and the samples in the d/p group were subjected to plastination and deplastination processes explained below.

**Silicone plastination of the kidneys:** In this study, all of the silicone plastination protocols were performed at the Plastination Laboratory of the Department of Veterinary Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine in Firat University. The necessary dissection procedures were performed, and the excess connective and fatty tissues were removed. Kidneys were taken to the dehydration step after being fixed with 10% formalin solution for a week. Afterward, fluid of kidney tissue was replaced with acetone (99.5%) in an insulated steel tank that kept -25 °C in a deep freezer. At the third bath of the acetone dehydration, tissue infiltration of the acetone was reached above 90% concentration. The whole dehydration process took 15 days. The samples were also kept in acetone for five days at room temperature to remove fat from the tissue. Following acetone exposure, the kidneys were taken into the vacuum tank to perform forced impregnation. This enforcement was performed by impregnating the S10, activated with an S3 catalyst in a 1/100 ratio. Forced impregnation of S10 took six days at room temperature. Then the samples were kept in an S10 / S3 mixture outside the vacuum tank for a day and outside the silicone-catalyst mixture the following day. The samples were taken out from the vacuum tank and kept for discharge of the excess silicone, which took five days. At the last step, the gas curing and hardening process was performed with S6, and the plastination process was completed. The hardening step in the gas curing unit took three days. In brief, the silicone plastination of sheep kidneys took 36 days.

**Tissue processing protocol and deplastination:**

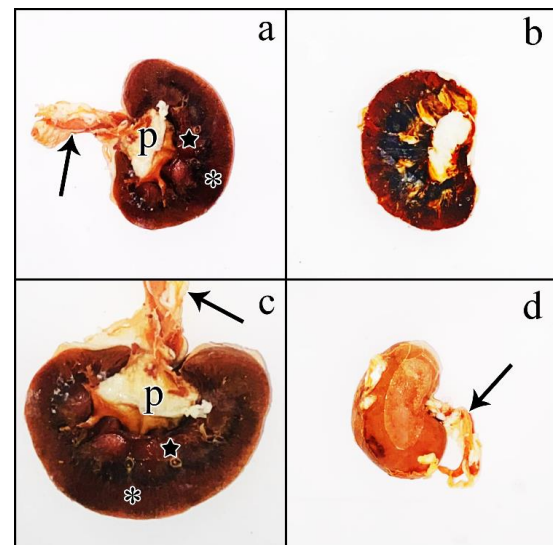
Kidneys in the control group were fixed in a 10% formalin solution. After fixation, the kidneys were dissected into small pieces, and total fixation was achieved 24 hours after the beginning of the experiment. Fixed samples were washed under tap water overnight and dehydrated in increasing alcohol series. Following dehydration, samples were cleared in xylene, then subjected to paraffin infiltration and embedded into paraffin. The obtained paraffin blocks were stored at room temperature for further examination. For deplastination, previously plastinated kidneys in the p/d group were kept in absolute alcohol for 24 hours. Subsequently, depolymerization of plastination substances was carried out by incubating kidneys in methylbenzene for 48 hours. Tissue softening was checked regularly by punching a needle, and at the end of the period, total kidney samples were dissected into small pieces. The samples were embedded into paraffin blocks after routine histological tissue processing protocol. The paraffin blocks were stored at room temperature for further sectioning (Ramos et al., 2018).

**Hematoxylin-Eosin and PAS staining protocol:** Five  $\mu\text{m}$  thickening sections were taken from the paraffin blocks with a rotary microtome, and the sections were transferred to positive charged adhesive slides. Paraffin depolymerization was performed by incubating the sections at 56 °C for an hour. The sections were cleared in xylene for hematoxylin and eosin (H&E) and Periodic Acid-Schiff (PAS) staining used for morphological examination and basement membrane evaluation. The sections rehydrated in decreasing alcohol series and brought to distilled water. H&E stained sections were stained in hematoxylin for 8 minutes, and then the samples were washed in tap water for 5 minutes. The sections were stained in eosin for a minute, and samples were immersed through increasing alcohol series. At the last step, stained samples were cleared in xylene and mounted with entellan. PAS staining was performed with a ready-to-use kit (Bio-Optica, Milano-Italy, Cat. No: # 04-130802). All steps of the PAS staining were performed according to the manufacturer's instructions. Sections passed through increasing alcohol series after PAS staining protocol, cleared in xylene, and mounted with entellan. Both H&E and PAS stained samples were examined under a light microscope, and micrographs were captured by a ZEISS Axio microscope (Bancroft et al., 2013).

**Statistical analysis:** The samples' measured weight, width, and length data in control and d/p groups were evaluated statistically. Non-parametric Mann-Whitney U test was used as statistics. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

**Results**

**Anatomical Results:** Both inner and outer anatomical shapes of plastinated kidneys were quite similar to their natural appearance and retained their previous morphological characteristics (Figure 1). Capsula fibrosis was observed with its standard structure. The structure of the capsula adiposa was also preserved during the plastination process in one of 5 samples. Color range difference between cortex renalis and medulla renalis was less evident in plastinated kidneys then deplastinated (Figures 1a, 1b, 1c). The malpighi pyramides and A. interlobaris were observed clearly in plastinated samples. When the kidney was divided into anteroposterior semi parts, it was observed that sinus renalis was following the hilus renalis. The hilus renalis, which can be observed as a fold in the margo medialis, and the ureter originating from this anatomical structure were clearly observed (Figure 1d). The difference for weight, wide and height of the control group significant in contrast to P/D group ( $P < 0.01$ ). Graphical demonstration of the statistical analysis was shown in Figure 2.



**Figure 1.** Inner (a,b,c) and outer (d) photographs of the plastinated kidneys. Renal cortex (\*), medulla (star) pelvis renalis (p) and ureter (arrow) as shown

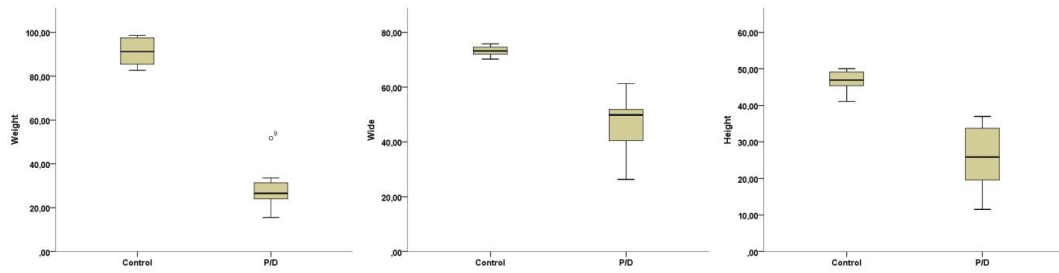
**Histological result:**

**Hematoxylin and eosin results:** Light microscopic micrographs of kidney sections in control and plastination-deplastination groups are shown in Figure 3. Sheep kidneys in the control group were found with typical histological structures. The proximal and distal convoluted tubules, cortical and juxtamedullary glomeruli were widespread within the renal pyramids. The renal vascular structures were normal morphology, and the arterioles at the

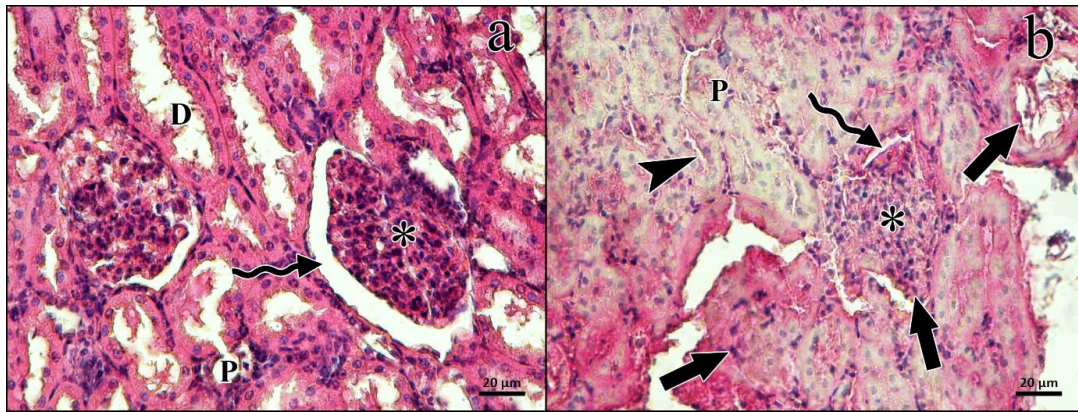


vascular pole of the renal corpuscles were normal as expected. The renal glomeruli were observed in

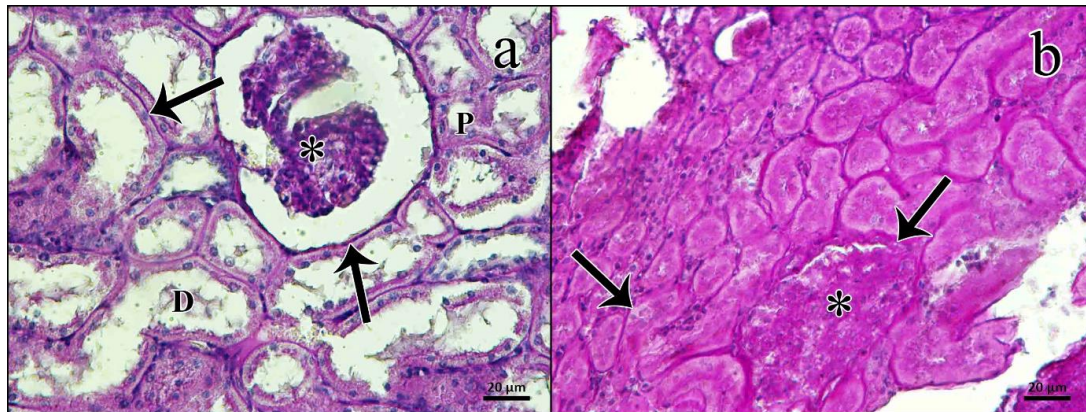
fresh tissues as normal morphology with a glomerular capillary network, mesangial stroma,



**Figure 2.** Boxplot results of statistical analysis for weight, wide and height. All evaluated parameters of groups were significantly different ( $p < 0.01$ ).



**Figure 3.** Micrographs of H&E stained control (a) and p/d (b) groups. Glomerulus with normal and shrunken morphology (asterix) in control and p/d groups. Proximal (P) and distal (D) convoluted tubules were easily distinguished in control group instead of incomprehensible morphology in p/d group. Bowman's space in control group (curved arrow) was normal but the space almost disappeared in p/d group. Cell nuclei in p/d group were stained hematoxylin (thick arrow). In p/d group, tubular lumen (arrow head) is observed as shrunken. Staining; H&E, Bar: 20  $\mu$ m.



**Figure 4.** Micrographs of PAS stained control (a) and p/d (b) groups. Regular and normal shaped basement membranes (arrow) of glomerular basement membrane and tubular system in control group. In control group, glomerulus with normal morphology as observed normal glomerular capillary network and mesangium (asterix). Pseudo-thickened and undulated basement membrane in p/d group's glomerular basement membrane and tubular system (arrow). Shrunken and pseudo-positivity of PAS in p/d group (asterix). Staining; PAS, Bar: 20  $\mu$ m.

mesangial cells, and podocytes. Bowman's space between the glomeruli and the Bowman's capsule was observed in all glomerulus. The renal pyramids, loop of henles and collecting tubules were found normal, and the collecting tubules were longitudinal

at the medullary level (Figure 3a). On the other hand, it was difficult to take sections from paraffin blocks of the p/d group because the tissue samples were pouring as dust while sectioning, but we could obtain small pieces of tissue samples from this



group. When the stained sections were evaluated under a light microscope, it was possible to observe cortical structures such as glomeruli, proximal and distal tubules. However, it was impossible to observe medullary structures due to the loss of this part during sectioning. Cortical structures were tightly packed, and Bowman's space was observed as almost disappeared (Figure 3b). In p/d samples, it was more difficult to distinguish the glomerular structures from each other than fresh kidneys. In H&E stained sections, glomerular, tubular, and capillary cell nuclei were visible in H&E stained sections. However, the eosin stain of cellular cytoplasm in this group was poor and total tissue was paler than the control group. Brush borders of proximal tubules of the p/d group were uncertain. Also, it was difficult to distinguish the proximal and distal tubules from each other without considering morphological differences.

**PAS results:** The control group's basement membranes of fresh tissues were regular in the PAS stained sections (Figure 4a). The basement membrane in the p/d group was PAS-positive, as observed in control group sections. However, it was thicker than the control group, probably due to the plastination-deplastination protocol. Additionally, the glomerular basement membrane of p/d group sections was unclear in contrast to the basement membrane of control group tubules. PAS positivity was also observed in the glomerulus of the kidney. However, the PAS positivity was not only observed in capillary basement membranes but also observed within the whole of the mesegial stroma. Although it only has to be observed at the basement membrane, the whole tissue sections of the p/d group were slightly pseudo positive for PAS. Kidney medulla samples were almost PAS negative because of deficiency of PAS reactions (Figure 4b).

## Discussion and Conclusion

Scientific and technological developments have been shed light on tissue preservation methodologies until today. Today, it is highlighted that the plastinated samples can keep their natural morphological structure, but hardening is a disadvantage of this methodology when used for educational purposes (Bolintineanu et al., 2017; Reiderer, 2014). As pointed out in previous research studies (Ekim et al., 2017; Ottane et al., 2015), plastination provides dry, odorless, and durable specimens. Recent studies reported successful DNA extraction from plastinated tissues (Ottane, 2020). There are some articles on morphological and histological applicability of plastination of the urethra, esophageal muscles, and carpal tunnel (Fritsch et al., 2006; Sora and Gensen-Strab, 2005;

Wang et al., 2007). Also, the kidney was reported with its suitability for plastination techniques (O'sullivan et al., 1995). However, in the literature review, no study did not investigate the microscopic evaluation of deplastinated kidneys. We observed a significantly reduced kidney size that was already reported for various plastinated organs in previous studies (Ameko et al., 2013; Rahul et al., 2020). As mentioned in the material and method, in this study, we aimed to investigate the microscopic structure of plastinated kidneys, which were deplastinated with alcohol and methylbenzene due to these chemicals were reported with successful results for deplastination of heart tissue previously (Baygeldi et al., 2020). In this respect, the result of this study of plastinated samples was consistent with the literature. The plastinated kidneys in the p/d group were strong with natural morphological structures and appropriate for educational use. We achieved partial success for histological examination in deplastinated kidneys with alcohol and methylbenzene, as Rahul et al. (2020) reported. They stated successful histological sectioning of the plastinated oral carcinoma with deplastination by 5% sodium methoxide dissolved in methanol (Rahul et al., 2020). We believe that difficulties in sectioning deplastinated samples in our study might result from dehydration during plastination or a large amount of parenchyma in the kidney instead of a muscular and more intact structure. We reported successful deplastination in the heart, which is almost occupied by heart muscle cells. Both of the reasons might be synergistically responsible for the limitations of deplastination in the kidney tissue. In this third possibility, we believe that S10 might not be impregnated in sufficient volume to keep microscopic structures intact for histological examination. Therefore, long-term shrinkage in dehydrated parenchyma might result from microscopic pseudo degenerations in deplastinated kidneys. According to a previous study (Brown et al., 2002), it was reported that 2 or 3 series of acetone baths should be performed depending on the samples for dehydration during plastination. Our study achieved over 90% concentration at the third bath.

Additionally, the ratio of the S3-S10 mixture used in forced impregnation step varies between previous studies (Jia-nan and Honq-jin, 2013; Jong and Henry, 2007). We found that the S3 catalyst at a ratio of 100/1 is sufficient to activate the S10 mixture at room temperature. In the gas curing step, we used the previously reported protocol Ravi and Bhat (2011) and observed it suitable for obtaining elastic samples. Although it may require effort to deplastinate large tissues, strong evidence demonstrates that deplastination with alcohol and

methylbenzene or other chemicals can allow histological examination of plastinated organs. In a previous study, Ravi and Bhat (2011) reported a slight delay for staining of deplastinated histological sections during staining protocol. The authors concluded as the tissues can be examined under light and electron microscope if the appropriate deplastination protocols are performed. In our study, we found the opportunity to capture images under the light microscope after deplastination with pale eosin staining. Therefore, it is possible to say that pale eosin staining in our results is consistent with the previous study of Ravi and Bhat (2011). It may be related to staining delay for deplastinated sections. Interestingly we did not observe any delay or pale staining in PAS stained sections in contrast to the H&E staining protocol. Overall, we observed slightly pseudo positivity at the whole tissue in PAS stained samples. Both Grondin et al. (1994) and our results demonstrate strong evidences that deplastinated tissue samples can be examined for histologically depending on the administered protocol.

In conclusion, the plastinated samples can be accessible when used for educational purposes or examination and do not require any care for transport of samples to elsewhere. Plastination allows any organ or tissue to be examined safely without the requirement of self-care instruments suggested to be used when samples were preserved in chemicals such as formaldehyde. On the other hand, we believe that plastination-deplastination may allow researchers to examine morphological structures of organs whenever required, even after long years. Our results demonstrated that plastinated kidneys were dry, clean, durable, odorless, and we observed partially successful results for histological examination after alcohol and methylbenzene deplastination. Therefore, we believe that improvements in plastination-deplastination methodology will open a new research area for morphologists, and more studies are required for protocol optimization.

### Conflict of Interest

The authors stated that they did not have any real, potential or perceived conflict of interest

### Ethical Approval

This study was performed with the permission of the Experimental Animals Local Ethics Committee in Dicle University with a 35582840-604-02 approval number.

### Funding

This work is not supported by any Project.

### Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 1% as stated in the report uploaded to the system.

### Author Contributions

Motivation / Concept: BCG, BB

Design: UŞ

Control/Audit: UŞ

Data Collection and/or Processing: BCG

Analysis and/or Interpretation: BB, UŞ

Literature Review: UŞ

Posted By: BB, UŞ

Critical Review: BCG

### References

- Al-Ali S, Blyth P, Beatty S, 2009: Correlation between gross anatomical topography, sectional sheet plastination, microscopic anatomy and endoanal sonography of the anal sphincter complex in human males. *J Anat*, 215, 212-220.
- Ameko E, Achio S, Alhassan S, 2013: Further studies on plastinated teaching aids in Ghana, Three bovine hearts and kidneys. *IJPAS*, 16-34.
- Baygeldi SB, Guzel BC, Seker U, Ozkan E, 2020: Plastinasyon/Deplastinasyon Uygulanmış Koyun Kalbinde Doku Morfolojisinin Işık Mikroskopik Yönden İncelenmesi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 13, 52-55.
- Bolinteanu SL, Pop E, Stancu G, 2009: Anatomical structures preservation using plastination techniques. *Mater Plast*, 54, 221-224.
- Bouchet F, Harter S, Le Bailly M, 2003: The state of the art of paleoparasitological research in the Old World. *Mem I Oswaldo Cruz*, 98, 95-101.
- Brown M, Reed R, Henry R, 2002: Effects of dehydration mediums and temperature on total dehydration time and tissue shrinkage. *J Int Soc Plastination*, 17, 28-33.
- Buckley SA, Evershed RP, 2001: Organic chemistry of embalming agents in Pharaonic and Graeco-Roman mummies. *Nature*, 413, 837-841.
- Ekim O, Hazıroğlu RM, İnsal B, 2017: A modified S 10B silicone plastination method for preparation and preservation of scaled reptile specimens. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 64, 155-160.
- Fritsch H, Pinggera GM, Lienemann A, 2006: What are the supportive structures of the female urethra? *Neurorol. Urodyn*, 25, 128-134.
- Grondin G, Grondin GG, Talbot BG, 1994: A study of criteria permitting the use of plastinated specimens for light and electron microscopy. *Biotech Histochem*, 69, 219-234.

- Jia-nan ZW-xZ, Hong-jin YS-bS, 2013: Effects of time and temperature of curing on hardness of organs in silicone plastination. *Acta Anat. Sin*, 44, 368.
- Jong K, Henry R. Silicone Plastination of Biological Tissue, 2007: Cold-temperature Technique Biodurri S10/S15 Technique and Products. *J Int Soc Plastination*, 22, 2-14.
- Lan Q, Smith MT, Tang X, 2015: Chromosome-wide aneuploidy study of cultured circulating myeloid progenitor cells from workers occupationally exposed to formaldehyde. *Carcinogenesis*, 36, 160-167.
- O'sullivan E, Mitchell B, 1995: Plastination for gross anatomy teaching using low cost equipment. *Surg Radiol. Anat*, 17, 277-281.
- Ottone NE, Cirigliano V, Bianchi HE, 2015: New contributions to the development of a plastination technique at room temperature with silicone. *Anat Sci Int*, 90: 126-135.
- Ottone NE, Baptista CA, Del Sol M, 2020: Extraction of DNA from plastinated tissues. *Forensic Sci Int*, 309, 110199.
- Pereira-Sampaio MA, Marques-Sampaio BP, Sampaio FJ, 2011: Shrinkage of renal tissue after impregnation via the cold Biodur plastination technique. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol*, 294, 1418-1422.
- Rahul T, Francis DV, Pandit S, 2020: Deplastination: Preservation of histological structures and its anticipated role in the field of histopathology. *Clin Anat*, 33, 108-112.
- Ramos ML, De Paula TAR, Zerlotini MF, Silva VHD, Carazo VHD, De Paula MF, Silva FFR, Santana ML, Silva LC, Ferreira LBC, 2018: A Comparison of Different Deplastination Methodologies for Preparing Histological Sections of Material Plastinated with Biodur® S10 / S3. *J. Plast*, 30(1),10-15.
- Ravi SB, Bhat VM, 2011: Plastination: A novel, innovative teaching adjunct in oral pathology. *JOMFP*, 15, 133.
- Rhodes A, Layton C, Bancroft JD, 2013: Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. Seventh edition., China, Churchill Livingstone.
- Riederer BM, 2014: Plastination and its importance in teaching anatomy. Critical points for long-term preservation of human tissue. *J Anat*, 224, 309-315.
- Rouiller C, Muller AF, 1969: The Kidney Morphology, Biochemistry, Physiology. First edition., USA.
- Sora MC, Genser-Strobl B, 2005: The sectional anatomy of the carpal tunnel and its related neurovascular structures studied by using plastination. *Eur J Neurol*, 12,380-384.
- Steinke H, Rabi S, Saito T, 2008: Light-weight plastination, *Ann Anat*, 190, 428-431.
- Von Hagens G, 1986: Heidelberg Plastination Folder: Collection of Technical Leaflets of Plastination. Second edition., Germany.
- Wang Q, Xu S, Tu L, 2007: Anatomic continuity of longitudinal pharyngeal and esophageal muscles, *The Laryngoscope*, 117, 282-287.
- Zendehdel R, Fazli Z, Mazinani M, 2016: Neurotoxicity effect of formaldehyde on occupational exposure and influence of individual susceptibility to some metabolism parameters, *Environ Monit Assess*, 188, 648.
- \*Correspondence:** Barış Can GÜZEL  
Firat University, Faculty of Veterinary Medicine,  
Department of Anatomy, Elazığ, Turkey.  
**e-mail:** bcguzel@firat.edu.tr

## The Effect of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) and *Nigella sativa* (Black Cumin) Oils on Wound Healing in Type-1 Diabetic Mice

Ibrahim AKIN<sup>1,a</sup>, Yalcin Alper OZTURAN<sup>1,b,\*</sup>, Cansu AKDOGAN<sup>1,c</sup>, Yilmaz KALKAN<sup>2,d</sup>, Ozge CEVIK<sup>3,e</sup>, Aykut Gokturk UNER<sup>4,f</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Aydin Adnan Menderes University, Isikli, Aydin, Turkey.

<sup>2</sup>Department of Electrical and Electronics, School of Engineering, Aydin Adnan Menderes University, Efeler, Aydin, Turkey.

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, School of Medicine, Aydin Adnan Menderes University, Efeler, Aydin, Turkey.

<sup>4</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Aydin Adnan Menderes University, Isikli, Aydin, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-4387-7115; <sup>b</sup>ORCID: 0000-0003-0589-5686; <sup>c</sup>ORCID: 0000-0001-5442-5117; <sup>d</sup>ORCID: 0000-0003-1261-5857; <sup>e</sup>ORCID: 0000-0002-9325-3757; <sup>f</sup>ORCID: 0000-0002-9242-8279.

Geliş Tarihi: 01.12.2021

Kabul Tarihi: 07.03.2022

**Abstract:** Wound healing is a well-known therapeutic challenge in animal and human medicine. This study aimed to investigate the effect of topical application of *Nigella sativa* (black cumin, NS) and *Hypericum perforatum* (St. John's Wort, HP) on wound healing in streptozotocin (STZ) induced diabetic mice. For this aim, 25 male BALB/c mice were divided into five groups: i. *Hypericum perforatum* (HP), ii. *Nigella sativa* (NS), iii. Standard saline solution 0.9% NaCl (NSS), iv. Natural extra virgin olive oil (OL), and v. Fusidic acid-*Centella asiatica* cream (FM). A single dose (200 mg/kg) of STZ was intraperitoneally administered to induce type-1 diabetes. After diabetes was induced, six symmetrical excision wounds were performed on the dorsal areas of mice using a dermal biopsy punch. Wound areas were photographed every three days for 21 days, and the images were analyzed using software to achieve the daily wound closure rate in pixel values. On day one and day 21, wound tissues were dissected, total protein and hydroxyproline levels were measured by ELISA. Statistically significant differences were found in hydroxyproline change rates between the NS group with HP, NSS, and FM groups ( $P<0.05$ ). The only significant difference was found between NS with OL groups ( $P<0.05$ ) on wound closure rate. This study illustrated that topically administered HP and NS may not have wound-healing effects in type-1 diabetic conditions in mice.

**Keywords:** Black Cumin, Mouse, *Nigella sativa*, Type-1 Diabetes, Wound Healing.

### *Hypericum perforatum* (Sarı Kantaron) ve *Nigella sativa* (Çörek Otu) Yağlarının Tip-1 Diyabetik Farelerde Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi

**Özet:** Yara iyileşmesi, hayvan ve insan sağlığında iyi tanınan terapötik bir durumdur. Sunulan çalışma STZ (streptozotosin) ile indüklenen diyabetik farelerde *Nigella sativa* (çörek otu, NS) ve *Hypericum perforatum* (sarı kantaron, HP) yağının deri yarası iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırılmasını amaçladı. Bu amaçla, 25 adet erkek BALB/c ırkı fare gruba ayrıldı: i. *Hypericum perforatum* (HP), ii. *Nigella sativa* (NS), iii. Fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl, NSS), iv. Natürel sızma zeytinyağı (OL) ve v. Fusidik asit-*Centella asiatica* kremi (FM) olacak şekilde beş gruba ayrıldı. Tip-1 diyabeti indüklemek için intraperitoneal olarak tek doz (200 mg/kg) STZ uygulandı. Diyabet induksiyonundan sonra farelerin sırt bölgelerinde dermal biyopsi punch kullanılarak altı simetrik eksizyon yarası oluşturuldu. Yaralar 21 gün boyunca her üç günde bir fotoğraflandı ve günlük yara küçülme oranlarını piksel değeri olarak elde etmek için bu fotoğraflar yazılım aracılığı ile analiz edildi. Çalışmanın 1. ve 21. günlerinde yara dokuları diseke edildi ve ELISA ile hidroksiprolin ve total protein düzeyleri ölçüldü. HP, NSS ve FM grupları ile NS grubu fareler arasında hidroksiprolin değişim oranlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu ( $P<0,05$ ). Yara kapanma oranında ise sadece NS ile OL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi ( $P<0,05$ ). Bu çalışmanın sonuçları, topikal olarak uygulanan HP ve NS'nin farelerde tip-1 diyabetik koşullarda yara iyileştirici etkileri olmayabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Çörek Otu, Fare, *Hypericum perforatum*, *Nigella sativa*, Sarı Kantaron, Tip-1 Diyabet, Yara İyileşmesi.

## Introduction

It is known that individuals with diabetes suffer from chronic unhealable wounds. Wound healing is the unification process in a specific pattern and order of epithelial, endothelial, inflammatory cells, platelets, and fibroblasts (Lerman et al., 2013; Loomans et al., 2004). This process is influenced by several systemic and local variables such as

oxygenation, infections, age, sex hormones in aged individuals, stress, diabetes, obesity, nutrition, and medications (Guo and Dipietro, 2010). Approaches for wound healing have significant advantages for the patients. However, they may also have drawbacks, such as the relative cost of products or the undesirable side effects of the chemicals used.

Therefore, studies have focused on alternative remedies of natural wound healing products such as natural herbs (Sharma et al., 2021).

*Hypericum perforatum* is considered as a valuable herbal medicine. It contains hyperforin, flavonoids, and hypericin (Fu et al., 2006) which may be used as antiseptic, anti-inflammatory, and wound healer (Sharma et al., 2021; Suntar et al., 2010). *Nigella sativa*, known as black cumin in English literature, is an herb that originated mainly from South Asia and the Middle East (Ghedira, 2006). *Nigella sativa* and its components have many pharmacological effects; antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer are only a few examples (Khader and Eckl, 2014). The activation of angiogenesis enhanced fibroblast proliferation, and subsequent collagen synthesis is the fundamental mechanism by which *Nigella sativa* promotes wound healing (Shahani et al., 2013).

Type-1 diabetes is a chronic metabolic disease characterized by autoimmune degradation of pancreatic  $\beta$ -cells. Hyperglycemia and dyslipidemia lead to the failure of the wound healing processes which causes an increase in mortality of type-1 diabetes (American Diabetes Association, 2014; Petrie et al., 2018). Treatments of diabetic wounds are challenging as their healing processes are extremely slow and can last for weeks. Although there has been a significant effort with the enhanced technology, the specific pathogenesis and treatment of the impaired wound healing in diabetes remains unclear (Bagdas et al., 2014; Spampinato et al., 2020). The present study aimed to investigate the wound healing effect of *Hypericum perforatum* and *Nigella sativa* in type-1 diabetic mice.

## Materials and Methods

**Animal Preparation:** This study, including animal experiments and protocols, was approved by the Institutional Animal Care and Ethical Committee of Aydin Adnan Menderes University (ADU-HADYEK, approval number #64583101.2017.051). Twenty-five male BALB/c mice, six weeks of age, were used. Mice were housed individually in the appropriate environment (12 hours light/12 hours dark) and room temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Tap water and chow diet (Mice chow feed, Radon Medical, Dikmen, Ankara, Turkey) were given ad libitum. All mice were housed in individual cages. After an initial environmental adaptation period (10 days), mice were randomly divided into five groups ( $n=5/\text{each}$ ); group 1 *Hypericum perforatum* (HP, Zade Vital<sup>®</sup>, Konya, Turkey), group 2 *Nigella sativa* (NS, Zade Vital<sup>®</sup>, Konya, Turkey), group 3 standard saline solution (NSS, 0.9% NaCl, Polifarma<sup>®</sup>, Tekirdag,

Turkey), group 4 natural extra virgin olive oil (OL, Zade Vital<sup>®</sup>, Konya, Turkey), and group 5 fusidic acid (Furacin Cream<sup>®</sup>, Zentiva, Luleburgaz, Turkey)-*Centella asiatica* (Madecassol Cream<sup>®</sup>, Bayer, Umraniye, Istanbul, Turkey) cream group (FM). Since *Hypericum perforatum* oil from a licensed company was macerated in natural extra virgin olive oil like other products on the market, one group (natural extra virgin olive oil treatment) (OL) was added to distinguish the effectiveness of the olive oil used in it.

**Induction of Type-1 Diabetes:** Type-1 diabetes was induced by administering a single (200 mg/kg) intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, United States) dissolved in sterile saline after overnight fasting. Blood glucose levels from the tail vein were measured one week after STZ injection to confirm diabetes (Guz et al., 2002). A commercial glucometer (Contour Plus<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen, Germany) measured blood glucose levels. A mouse with 300 mg/dL or above blood glucose levels was considered type-1 diabetic (Guz et al., 2002). Mice that are resistant to streptozotocin-induced type-1 diabetes were excluded from the study.

**Forming Full-Thickness Excision Wounds and Biochemical Analyses:** Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine HCl (50 mg/kg) (Ketasol<sup>®</sup> 10%, Interhas, Ankara, Turkey) and 10 mg/kg xylazine HCl (Xylazinbio<sup>®</sup> 2%, Bioveta, Ankara, Turkey). The dorsal areas of mice were fully shaved by using an electric shaver and disinfected with 70% ethanol. Six symmetrical excision wounds (5 mm diameter/each) were punched from cranial to caudal on the right and left of the medial line on each animal with a dermal punch (Moreira et al., 2015). With such a simple procedure, the wound model was constructed faster. At the end of the study, mice were sacrificed with isoflurane (Isoflurane USP<sup>®</sup>, Adeka Ilac, Istanbul, Turkey). Tissues from the healed wound areas were collected following the euthanasia procedure (Liu et al., 2013) and stored at  $-70^\circ\text{C}$  for further biochemical analysis. Tissues were dissected 1 mm around the healing scar tissue. Hydroxyproline and total protein levels were measured using the ELISA (SunRed<sup>®</sup> Mouse (Hyp), Shanghai, China, cat no: 201-02-0543) and BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Rockford, United States) from collected tissues. Tissues were weighed before and then homogenized by a mechanical homogenizer (Lab-Blender 400 Stomacher<sup>®</sup>, Interscience, Saint Nom la Br t che, France) in chilled water 10 minutes at 2000 rpm. Homogenates were transferred to Eppendorf tubes and centrifuged at 3000 rpm ( $4^\circ\text{C}$ ). Supernatants were transferred to new Eppendorf tubes for total protein, and hydroxyproline

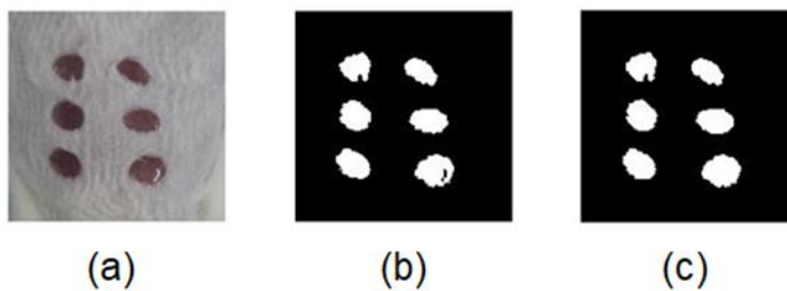


measurements were performed according to the manufacturer's instructions.

#### Photographic Follow-up of Excision Wounds:

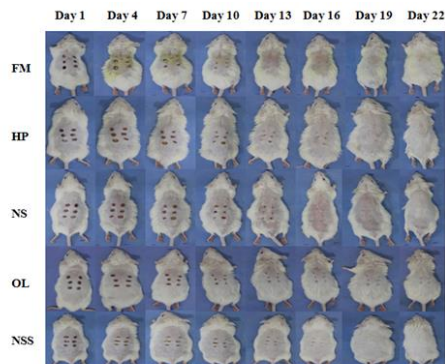
Image processing techniques have been used to assess wound healing, and methodologies that have been well addressed in the literature have been performed in the present study (Marotte et al., 2010; Saranya et al., 2016). The methodology of using images of wound areas to monitor the daily closure amount of the wound area was preferred in the research as it is a non-invasive method that reduces measurement-related errors. Wound areas were photographed regularly, and these photos were stored on a computer. For this purpose, photographs of wound areas were taken every 3

experiment days following the treatments and forming excisional wounds, using a Canon® EOS 550D brand and model camera by the primary investigator (IA). Photographs were taken while the mice were anesthetized with isoflurane (Isoflurane USP®, Adeka Ilac, Istanbul, Turkey) to ensure the best picture quality. The photographs were analyzed in a computer with an interface (software) developed/written in the R2015a version using the MATLAB® (The Mathworks Inc., Natick, Massachusetts, USA) program, and the size of the wound area for each mouse was calculated. Steps involved in wound area processing are presented in Figure 1.



**Figure 1.** Excision wounds and image processing with the computer software.

(a) The image of excision wound areas, (b) the resolution of wound margins with image processing software, and (c) improving the quality of the image with MATLAB® software.



**Figure 2.** Photographic observations of excision wounds.

HP: *Hypericum perforatum* (St. John's Wort), NS: *Nigella sativa* (Black cumin oil), NSS: Normal saline solution (0.9% NaCl), OL: Natural extra virgin olive oil, FM: 2% fusidic acid+*Centella asiatica* cream.

The wound images were cropped in a particular frame, and the image's unwanted parts were deleted. Images were transformed into black and white images to quantify the area of the wound in pixels. The number of pixels belonging to the wound area was computed after counting the pixels corresponding to the white regions in contact with each image. Thus, the average daily closure rates of scar tissues were calculated as pixels. The wound closure rate was calculated according to the following equation:

The daily rate of wound closure = Cumulative pixel value / Day of wound closure

**Wound Management:** *Hypericum perforatum* oil (macerated in natural extra virgin olive oil), natural extra virgin olive oil (cold-pressed), and *Nigella sativa* oil (cold-pressed) were purchased from a commercial company (Zade Vital, Konya, Turkey) which holds product certificates and has an organic production permit. Wound creams *Centella asiatica* (titrated extract, 1% Madecassol Cream®, Bayer, Umraniye, Istanbul, Turkey) and fusidic acid (2% Furacin Cream®, Zentiva, Luleburgaz, Turkey) were obtained from companies that hold a license for medical use. Physiological saline (NSS) 0.9% isotonic sodium chloride solution was purchased from a company (Polifarma, Tekirdag, Turkey).

Treatments according to treatment groups were carried out every day until each mouse's wound healing was completed. The tip of the cotton swab was first dipped in the active ingredient and then applied to the wounds on the skin surface of the mice at one time until coating the wound surface, and cotton swabs were discarded in every mouse and application.

**Statistical Analyses:** A p-value equal to or less than 0.05 was considered as a statistically significant difference to reject the null hypothesis. Statistical analyses were performed using the SPSS®

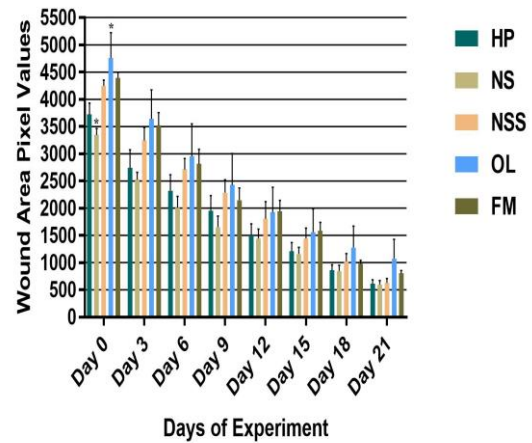
22.0 (Armonk, NY, USA) program. The Shapiro-Wilk test was used to determine the distribution of the obtained data, and the Levene test was used to evaluate the homogeneity of the variances. Two-way repeated-measures ANOVA was first conducted to determine whether interventions were significant on hydroxyproline concentration, wound closure rate, wound pixel values, body weights, and blood glucose levels. General linear model (GLM) procedures were conducted for *post hoc* Duncan multiple comparisons when the treatments were significant. The results are presented as mean±standard error of the mean.

**Results**

No mortality or infection was observed in treatment groups. According to treatment groups (mean±standard error of the mean), wound healing days are given in Table 1. Body weights and blood glucose levels of mice (mean±standard error of the mean) at the beginning and end of the experiment are given in Table 2.

**Wound Closure:** Pictures from the wound healing period and the rate of wound closures are given in Figure 2, Figure 3, and Table 1, respectively. Based on the photographic follow-up, the daily rate of wound closure between NS (707.74±82.28 pixels) with OL (904.78±111.38 pixels) groups was statistically significant (P<0.05). There was a statistically significant difference between NS and OL groups on the first day of the experiment (P<0.05, Figure 3). However, all other comparisons

on the rest of the experiment days among treatment groups were not statistically significant (P>0.05, Figure 3). The closure time of wound healing was not significantly different among other treatment groups (P>0.05, Table 1, Figure 3).



**Figure 3.** Treatment groups' mean wound area pixel values by days of treatment with standard error of the mean (SEM) bars.

\* Indicates a statistically significant difference between groups. HP: *Hypericum perforatum* (St. John's Wort), NS: *Nigella sativa* (Black cumin oil), NSS: Normal saline solution (0.9% NaCl), OL: Natural extra virgin olive oil, FM: 2% fusidic acid+*Centella asiatica* cream.

**Hydroxyproline Biochemistry Assays:**

Percentage changes in hydroxyproline levels are shown in Table 1. Changes in hydroxyproline levels were significantly higher in groups HP and NSS than in other treatment groups (P<0.05).

**Table 1.** The effect of topical application of treatments on wound size in pixels and hydroxyproline change rate per day throughout the experiment.

Groups	The daily rate of wound closure (pixel)	Hydroxyproline change rate throughout the experiment (%)	Day of wound healing
	Mean±SEM	Mean±SEM	Mean±SEM
HP	676.88±64.3 <sup>a, b</sup>	108.57±6.14 <sup>a</sup>	21±0
NS	707.74±82.28 <sup>a</sup>	67.10±9.10 <sup>b</sup>	19.2±0.73
NSS	908.37±182.63 <sup>a, b</sup>	127.56±1.36 <sup>a</sup>	18±1.34
OL	904.78±111.38 <sup>b</sup>	63.00±0.98 <sup>b</sup>	20.4±0.60
FM	826.07±61.88 <sup>a, b</sup>	83.59±7.41 <sup>b</sup>	21±0

a,b,c: Different superscripts are indicating statistical differences (P<0.05), SEM: Standard error of the mean, HP: *Hypericum perforatum* (St. John's Wort), NS: *Nigella sativa* (Black cumin oil), NSS: Normal saline solution (0.9% NaCl), OL: Natural extra virgin olive oil, FM: 2% fusidic acid+*Centella asiatica* cream.

**Discussion**

The OL group was included in the study to differentiate the effect of *Hypericum perforatum* clearer and more distinct. FM was also chosen as a control group since it represents common wound creams. Unlike acute wounds, diabetic wounds

exhibit a variety of molecular abnormalities in the healing process, including fibroblast and keratinocyte dysfunction (Lerman et al., 2013), angiogenesis deficiency (Loomans et al., 2004), and phagocytic activity failure (Khanna et al., 2010). Since ancient times, herbal medicines have been used to treat various ailments (Sharma et al., 2021).

NS extracts have been shown to have various therapeutic effects, including anti-inflammatory, antibacterial, antidiabetic, and antitumor effects (Khader and Eckl, 2014; Yaman et al., 2010). Wound healing has also been aided by HP's antispasmodic and antiseptic properties (Sharma et al., 2021; Sutar et al., 2010). In the present study, there was a statistically significant difference between NS and OL groups on the first day of the treatment

( $P < 0.05$ ). In contrast, there was no statistically significant difference in wound area pixel values between treatment groups on the rest of the experiment ( $P > 0.05$ ). However, a statistically significant difference was found in the wound closure rate between the NS and OL groups ( $P < 0.05$ ). Whereas hydroxyproline changes through the study were significantly higher in groups HP and NSS compared to other groups ( $P < 0.05$ ).

**Table 2.** Glucose levels and body weights of treatment groups at the beginning and end of the experiment.

Groups	Glucose levels (mg/dL)	Glucose levels (mg/dL)	Body weights (g)	Body weights (g)
	(Day 0)	(Day 21)	(Day 0)	(Day 21)
	(Mean±SEM)	(Mean±SEM)	(Mean±SEM)	(Mean±SEM)
HP	402.4±17.1	424±40.49	39.6±1.21	37±1.48
NS	469.2±31.35	515.6±36.53	42±0.99	40±1.31
NSS	401.4±16.83	432.8±46.38	42.2±1.02	41.6±0.98
OL	385±26.73	431.2±24.17	41.2±0.77	39±1.92
FM	463.4±24.2	505±25.6	43.4±0.51	41.2±0.58

SEM: Standard error of the mean, HP: *Hypericum perforatum* (St. John's Wort), NS: *Nigella sativa* (Black cumin oil), NSS: Normal saline solution (0.9% NaCl), OL: Natural extra virgin olive oil, FM: 2% fusidic acid+*Centella asiatica* cream.

Hydroxyproline is an amino acid almost exclusively confined to collagen. The hydroxyproline content of wound tissues is often measured to estimate the amount of collagen contained in the wound bed (Gao et al., 2006). Paheerathan et al. (2017) found that *Nigella sativa* (NS) seed powder has a significant accelerating wound healing activity in an incised wound model (Paheerathan et al., 2017). Sari et al. (2018) reported that *Nigella sativa* oil gel reduced inflammation and enhanced reepithelialization and granulation tissue development in diabetic wounds. In the present study, the increase in hydroxyproline of groups NSS and HP suggests that the collagen synthesis in mice that received HP and NSS was higher than NS and the other groups (Table 1). Wounds and burns should be kept moist during the recovery and treatment for optimum healing to ensure faster epithelialization, increased angiogenesis, and collagen synthesis compared to a dry environment. A moist wound condition often promotes the degradation of dead tissue and fibrin, resulting in less scarring (Junker et al., 2013). In the present study, topical application of standard saline solution seems to be the superior treatment for hydroxyproline change and wound closure rate (Table 1). Our findings might be interpreted as the pH, and hydrostatic pressure of the applied treatments higher or lower than healthy skin condition was speculated to influence the treatment's outcome (Lim et al., 2000; Percival et al., 2014). As a limitation in our study, osmolalities,

pH, and hydrostatic pressure of the present topical treatments were not evaluated, which might be considered confounding. In future studies, osmolality, pH, and hydrostatic pressure of topical agents should be investigated to determine their effects on wound treatments.

## Conclusion

Topical application of *Nigella sativa* and *Hypericum perforatum* oils did not accelerate wound healing in type-1 diabetic wound conditions in mice. Also, the present findings illustrated that the collagen synthesis and daily wound closure rate of *Nigella sativa* oil were higher than *Hypericum perforatum* oil. However, topical applied standard saline solution was the superior treatment in the present results. Further research considering osmolality, pH, and hydrostatic pressure in wound healing would be beneficial to reveal the effect of alternative topical wound healing agents.

## Acknowledgment

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper. This study was partially funded by the Aydin Adnan Menderes University, Scientific Research Foundation (BAP) (grant number: VTF- 17062).

## Conflict of Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Ethical Approval

This study including animal experiments and protocols was approved by the Institutional Animal Care and Ethical Committee of Aydin Adnan Menderes University (ADU-HADYEK, approval number #64583101.2017.051). In addition, the authors declared that Research and Publication Ethical rules were followed.

## Funding

This study was partially funded by the Aydin Adnan Menderes University, Scientific Research Foundation (BAP) (grant number: VTF- 17062).

## Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 11% as stated in the report uploaded to the system.

## Author Contributions

Motivation / Concept: IA, YAO, CA  
 Design: IA, CA  
 Control/Audit: IA, YK, OC, AGU  
 Data Collection and/or Processing: IA, YAO, CA  
 Analysis and/or Interpretation: YAO, CA  
 Literature Review: IA, YAO, CA, YK, AGU  
 Critical Review: IA, YAO, CA, YK, OC, AGU

## References

- American Diabetes Association, 2014: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37, 887.
- Bagdas D, Gul NY, Topal A, Tas S, Ozyigit MO, Cinkilic N, Gul Z, Etoz BC, Ziyankok S, Inan S, Turacozen O, Gurun MS, 2014: Pharmacologic overview of systemic chlorogenic acid therapy on experimental wound healing. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 387, 1101–1116.
- Fu P, Zhang WD, Liu RH, Li TZ, Shen YH, Li HL, Chen HS, 2006: Two new xanthones from *Hypericum japonicum*. *Nat Prod Res*, 20, 1237-1240.
- Gao Z, Wang Z, Shi Y, Lin Z, Jiang H, Hou T, Wang W, Yuan X, Zhao Y, Wu H, Jin Y, 2006: Modulation of collagen synthesis in keloid fibroblasts by silencing Smad2 with siRNA. *J Plast Reconstr Surg*, 118, 1328–1337.

- Ghedira K, 2006: La nigellecultivée: *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, 4, 220.
- Guo S, Dipietro LA, 2010: Factors affecting wound healing. *J Dent Res*, 89, 219-29.
- Guz Y, Torres A, Teitelman G, 2002: Detrimental effect of protracted hyperglycaemia on beta-cell neogenesis in a mouse murine model of diabetes. *Diabetologia*, 45, 1689-96.
- Junker JPE, Kamel RA, Caterson EJ, Eriksson E, 2013: Clinical Impact Upon Wound Healing and Inflammation in Moist, Wet, and Dry Environments. *Adv Wound Care*, 2, 348–356.
- Khader M, Eckl PM, 2014: Thymoquinone: An emerging natural drug with a wide range of medical applications. *Iran J Basic Med Sci*, 17, 950–957.
- Khanna S, Biswas S, Shang Y, Collard E, Azad A, Kauh C, Bhasker V, Gordillo GM, Sen CK, Roy S, 2010: Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLOS ONE*, 5, e9539.
- Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, Levine JP, Gurtner GC, 2013: Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am J Clin Pathol*, 162, 303–312.
- Lim JK, Saliba L, Smith MJ, McTavish J, Raine C, Curtain P, 2000: Normal Saline wound dressing– is it really normal? *Br J Plast Surg*, 53, 42-45.
- Liu X, Wang Z, Wang R, Zhao F, Shi P, Jiang Y, Pang X, 2013: Direct comparison of the potency of human mesenchymal stem cells derived from amnion tissue, bone marrow and adipose tissue at inducing dermal fibroblast responses to cutaneous wounds. *Int J Mol Med*, 31, 407-415.
- Loomans CJ, De Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, De Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ, 2004: Endothelial progenitor cell dysfunction a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of Type 1 diabetes. *Diabetes*, 53, 195–199.
- Marrotte EJ, Chen DD, Hakim JS, Chen AF, 2010: Manganese superoxide dismutase expression in endothelial progenitor cells accelerates wound healing in diabetic mice. *J Clin Invest*, 120, 4207-19.
- Moreira CF, Cassini-Vieira P, da Silva MF, da Silva Barcelos L, 2015: Skin wound healing model-excisional wounding and assessment of lesion area. *Bio-protocol*, 22, e1661.
- Paheerathan V, Piratheepkumar R, Kumaran K, 2017: Evaluation of wound healing activity of *Nigella sativa* seed powder on Wistar albino rats. *Sco J Biol Sci*, 6, 60-63.
- Percival SL, McCarty S, Hunt JA, Woods EJ, 2014: pH and wound repair. *Wound Repair Regen*, 22, 174-186.
- Petrie JR, Guzik TJ, Touyz RM, 2018: Diabetes, Hypertension, and cardiovascular disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Can J Cardiol*, 34, 575-584.
- Saranya G, Shagana Thasny S, Sobhia K, 2016: Parallel Implementation of Wound Image Analysis System for Diabetic Patient. *Int J Innov*, 5, 112-118.
- Sari Y, Purnawan I, Kurniawan DW, Sutrisna E, 2018: A Comparative Study of the Effects of *Nigella sativa* Oil

- Gel and Aloe Vera Gel on Wound Healing in Diabetic Rats. *J Evid-Based Integr Med*, 23, 2.
- Shahani MY, Memon S, Shahani SB, Bano U, Arain SN, 2013: Effect of Nigella sativa Extract Oil on Granulation Tissue in Cutaneous Wound: An Experimental Study in a Rabbit Model. *Med Forum Mon*, 24, 72–77.
- Sharma A, Khanna S, Kaur G, Singh I, 2021: Medicinal plants and their components for wound healing applications. *Futur J Pharm Sci*, 7, 53.
- Spampinato SF, Caruso GI, De Pasquale R, Sortino MA, Merlo S, 2020: The Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes: Looking among Old Drugs. *Pharmaceuticals*, 13, 60.
- Suntar IP, Akkol EK, Yilmazer D, Baykal T, Kirmizibekmez H, Alper M, Yesilada E, 2010: Investigations on the in vivo wound healing potential of Hypericum perforatum L. *J Ethnopharmacol*, 127, 468-477.
- Yaman I, Durmus AS, Ceribaşı S, Yaman M, 2010: Effects of Nigella sativa and silver sulfadiazine on burn wound healing in rats. *Vet Med Czech*, 55, 619-624.
- \*Correspondence:** Yalcin Alper Ozturan  
Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery,  
Aydin Adnan Menderes University, Isikli, Aydin,  
Turkey  
**e-mail:** alper.ozturan@hotmail.com

## Determination of Alpha S1-Casein, Beta-Lactoglobulin, Some Biochemical and Mineral Levels in Milk of Different Animals\*

Tuğçe Ayşen ŞENSOY<sup>1,a</sup>, Gülay ÇİFTÇİ<sup>1,b,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ondokuz Mayıs, Samsun, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0001-6674-7092, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0001-5384-2381

Geliş Tarihi: 14.12.2021

Kabul Tarihi: 27.01.2022

**Abstract:** In this study, it was aimed to investigate  $\alpha$ -S1-casein and  $\beta$ -lactoglobulin levels and some biochemical and mineral values in raw milk samples obtained from cows, buffaloes, sheep, and goats raised in Samsun. The study material consisted of 40 raw milk taken from goats, cows, sheep and buffaloes after milking in a farm in Samsun province Bafra district.  $\alpha$ -S1-casein and  $\beta$ -lactoglobulin levels in milk serum were determined using ELISA test kits. Calcium (Ca), magnesium (Mg), iron (Fe), zinc (Zn), total protein (TP), albumin (ALB), total cholesterol (TC), and triglyceride (TG) levels were measured using a spectrophotometric autoanalyzer. Sheep milk TP, ALB, GLO, TC levels were significantly higher than other milk samples. It was determined that the highest TP level was in sheep milk, followed by buffalo, goat, and cow milk, respectively. It was determined that the TG level in goat milk was significantly higher than other milk samples ( $P < 0.05$ ), followed by buffalo, sheep, and cow milk ( $P > 0.05$ ). It was determined that sheep milk contains more Ca, Mg, Fe, Zn than other milk samples, and the total mineral content is more prosperous than other milk samples. The mineral content of goat and cow milk was found similar; Zn mineral in cow milk was found slightly higher.  $\alpha$ -S1-casein and  $\beta$ -lactoglobulin levels were lower in goat milk samples than other milk samples. It was concluded that  $\alpha$ -S1-casein and  $\beta$ -lactoglobulin levels in goat milk were lower than in other milk samples (cow, sheep, and buffalo), and it could be recommended for those with milk allergies.

**Keywords:** Alpha S1-Casein, Beta Lactoglobulins, Milk, Mineral.

### Farklı Hayvanların Sütlerinde Alfa S1-Kazein, Beta-Laktoglobulin, Bazı Biyokimyasal ve Mineral Düzeylerinin Belirlenmesi\*

**Özet:** Bu çalışmada Samsun'da yetiştirilen inek, manda, koyun ve keçilerden elde edilen çiğ süt örneklerinde  $\alpha$ -S1-kazein ve  $\beta$ -laktoglobulin düzeyleri ile bazı biyokimyasal ve mineral değerlerinin araştırılması amaçlandı. Çalışma materyalini Samsun ili Bafra ilçesindeki bir çiftlikten sağım sonrası inek, manda, koyun ve keçilerden alınan 40 adet çiğ süt oluşturdu. Süt serumundaki  $\alpha$ -S1-kazein ve  $\beta$ -laktoglobulin seviyeleri ELISA test kitleri kullanılarak belirlendi. Spektrofotometrik otoanalizör kullanılarak kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), demir (Fe), çinko (Zn), total protein (TP), albümin (ALB), total kolesterol (TC) ve trigliserit (TG) seviyeleri ölçüldü. Koyun sütü TP, ALB, GLO, TC seviyeleri diğer süt örneklerinden anlamlı derecede yüksek bulundu. En yüksek TP düzeyinin koyun sütünde olduğu, bunu sırasıyla manda, keçi ve inek sütünde olduğu belirlendi. Keçi sütünde TG düzeyinin diğer süt örneklerine göre anlamlı derecede yüksek olduğu ( $P < 0.05$ ), bunu sırasıyla manda, koyun ve inek sütlerinin izlediği ( $P > 0.05$ ) belirlendi. Koyun sütünün diğer süt örneklerinden daha fazla Ca, Mg, Fe, Zn içerdiği ve toplam mineral içeriğinin diğer süt örneklerinden daha zengin olduğu belirlendi. Keçi ve inek sütünün mineral içeriği benzer bulundu, inek sütündeki Zn minerali biraz daha fazla bulundu. Keçi sütü örneklerinde  $\alpha$ -S1-kazein ve  $\beta$ -laktoglobulin seviyeleri diğer süt örneklerine göre daha düşük bulundu. Keçi sütündeki  $\alpha$ -S1-kazein ve  $\beta$ -laktoglobulin düzeylerinin diğer süt örneklerine (inek, koyun ve manda) göre daha düşük olduğu ve süt alerjisi olanlara önerilebileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Alfa S1-Kazein, Beta Laktoglobulinler, Mineral, Süt.

### Introduction

Milk is a secretion of the mammalian gland, whose physical characteristics and composition vary between species. The use of milk from domesticated mammalian animals in the human diet has a long tradition. Today, cattle, buffaloes, sheep, goats, and camels are used in various parts of the world to produce milk and milk products for human consumption (Goff, 2016). Every mammal species has a unique milk composition in major and

minor constituents such as proteins, polyunsaturated fatty acids, vitamins, and minerals (Fukuda, 2013). Approximately 98% of lipids in milk are triglycerides (Grummer, 1991). However, micronutrients such as small amounts of vitamins and minerals contribute significantly to the properties of milk. Lactose is the only carbohydrate in milk, and it is a disaccharide composed of glucose

and galactose. Lactose is essential for brain and nerve development (Varma, 1962).

Milk proteins are divided into caseins (80%) and serum proteins (20%). Caseins are composed of alpha (S1), alpha (S2) caseins, beta casein and kappa casein. Contribution of milk proteins to growth and development, besides its effectiveness in tissue differentiation; It has been reported to have positive effects on calcium absorption and immune functions, reduce blood pressure and cancer risk, be effective in the control of body weight, and protect against dental caries (Jain, 1998). Almost 20% of all milk proteins are milk serum proteins. The main milk serum proteins are lactalbumin, lactoglobulin, immunoglobulin, and proteose peptones.  $\beta$ -lactoglobulin is more important than other fractions, and in terms of amount, it constitutes more than half of the total lactalbumin. It is rich in amino acids of leucine and lysine. It has been reported that  $\beta$ -lactoglobulin plays a role in carrying passive immunity in newborns and the regulation of phosphorus metabolism in the mammary gland. Since cysteine is present in the amino acid structure of this protein, it is crucial for glutathione (GSH) synthesis and muscle development. In addition to all these, it has been reported to act as a fatty acid or lipid-binding protein (De Wit, 1998; Yerlikaya, 2010).

Every infant needs to get the milk of his mother for growth and development, optimum bone health and immune system development, and increasing the quality of life (Fox and Mcsweeney, 1998). Cow's milk proteins are the first proteins babies take after breast milk usually. In the last few decades, allergic reactions to casein appear to have become more prevalent decades (Wal, 2002). The primary allergens in cow's milk, according to most research, are  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, and casein (Chen et al., 2014; Pessato et al., 2016). Among people allergic to milk, 51% are allergic to  $\alpha$ -lactalbumin, and 82% are allergic to  $\beta$ -lactoglobulin (Exl, 2001).

This study aimed to investigate and comparatively evaluate alpha S1-casein, beta-lactoglobulin levels, and some biochemical and mineral values in raw milk samples obtained after milking from cows, buffalo, sheep, and goats raised in Samsun.

## Materials and methods

**Study area and animals:** The study material consisted of 40 raw milk taken from ten goats, ten cows, ten sheep, and ten buffaloes in Bafra, Samsun. Animals were kept in traditional barns, and the feeding was traditional. Milk samples were collected in sterile containers within an hour on the

same day grown in the same farm under similar soil conditions in November and brought to the laboratory in a thermos bag in ice molds. Milk serums were removed on the same day, aliquoted, and kept at -20 °C until analysis.

**Preparation of Milk Serum:** Milk samples obtained after milking from different animal species were centrifuged by two different methods used in ELISA and biochemical analysis.

Milk serum was obtained by centrifugation at 2000 rpm for 20 minutes as specified in the kit procedure for ELISA. The milk samples obtained were stored at -20 °C until analysis with ELISA test kits.

Milk serum was obtained by centrifuging milk samples at 15 000 rpm for 20 minutes in biochemical analysis (Charkoftaki et al., 2010). The levels of calcium (Ca), magnesium (Mg), iron (Fe), zinc (Zn), total protein (TP), albumin (ALB), total cholesterol (TC), and triglycerides (TG) in the milk samples obtained were kept at -20 °C until analyzed by spectrophotometric method.

**Determination of  $\alpha$ -S1-casein and  $\beta$ -lactoglobulin Levels in Milk Serum:**  $\alpha$ -S1-casein and  $\beta$ -lactoglobulin levels in milk serum were determined using (Biont, Bovine- $\alpha$ -S1-casein, China, Biont, Bovine- $\beta$ -lactoglobulin, China) ELISA test kits and following the kit procedure. In this study, for the determination of  $\alpha$ -S1-casein and  $\beta$ -lactoglobulin levels in cow, sheep, goat, and buffalo, the amino acid composition of  $\alpha$ -S1-casein and  $\beta$ -lactoglobulin and its genetic diversity were similar in buffalo, sheep, goat, and cow (85-95%) Bovine specific ELISA kit was used due to (Borkova and Snaselona, 2005; Hayam et al., 2017; Masoodi and Shafi, 2010). The ELISA's were performed according to the manufacturer's instructions, and the ELISA reader measured the absorbances (as OD values) of the ELISA plates.

**Determination of Calcium, Magnesium, Iron, Zinc, Total Protein, Albumin, Total Cholesterol and Triglyceride Levels in Milk Serum:** Milk serum Mg, Ca, Fe, Zn, TG, TC, TP, and ALB levels were measured spectrophotometrically method (Barbour and Davisdon, 1988; Bucola and David, 1973; Fossati and Prencipe, 1982; Grant and Kachmar, 1976; Makino et al., 1982; Michaylova and Illkova 1971; Sacks, 1999; Stookey, 1970; Weichselbaum, 1946) in an autoanalyzer (Biosistem A25, İspanya) using Biosistem kits (Mg, Ca, Fe, Zn, TG, TC, TP, ALB). The results of the analyses were calculated by optical reading at a particular time and temperature.

The serum globulin level was calculated by subtracting the albumin value from the corresponding total protein value. The concentration of serum globulin was expressed as



g/ dl. The A/G ratio was calculated based on serum albumin and globulin measurements.

**Statistical Analyses:** SPSS statistical software for Windows (SPSS-PC, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) was used for statistical analysis. One-way analysis of variance (ANOVA), Duncan's multiple ranges, and Pearson correlation tests were used to determine the differences and relationships among the groups.

## Results

**Some Biochemical Parameter Levels in Milk Serum:** The average and standard error values (mean± SE) of TP, ALB, GLO, ALB / GLO, TC, and TG levels in raw milk samples from goats, cows, sheep, and buffaloes raised on a farm in Samsun, are given in Table 1.

**Table 1.** Total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLO), albumin / globulin (ALB / GLO), total cholesterol (TC), triglyceride (TG) levels in cow, sheep, goat and buffalo milk.

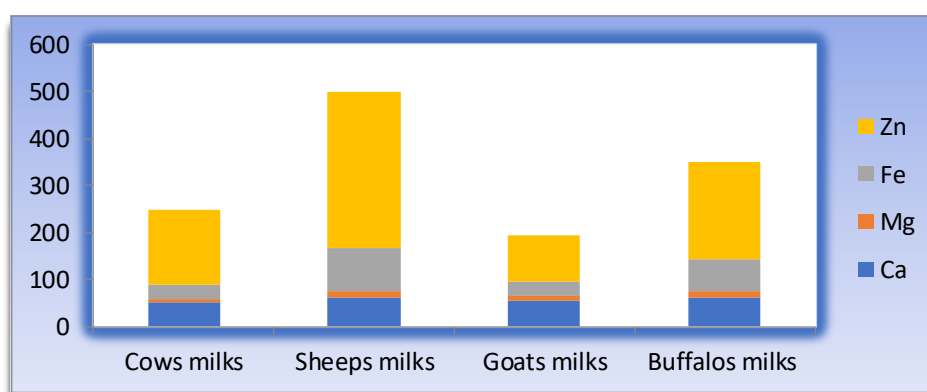
	Cow milk	Sheep milk	Goat milk	Buffalo milk
<b>TP (g/dl)</b>	1,7±0,07 <sup>a</sup>	4,83±0,33 <sup>c</sup>	1,96±0,1 <sup>ab</sup>	2,32±0,15 <sup>b</sup>
<b>ALB (g/dl)</b>	0,86±0,07 <sup>a</sup>	1,35±0,07 <sup>b</sup>	1,13±0,09 <sup>ab</sup>	1,05±0,09 <sup>a</sup>
<b>GLO(g/dl)</b>	0,84±0,22 <sup>a</sup>	3,48±0,36 <sup>b</sup>	0,82±0,3 <sup>a</sup>	1,27±0,81 <sup>a</sup>
<b>ALB/GLO</b>	1,03±0,11 <sup>b</sup>	0,43±0,056 <sup>c</sup>	1,37±0,1 <sup>a</sup>	0,83±0,084 <sup>b</sup>
<b>TC (mg/dl)</b>	1,4±0,16 <sup>a</sup>	2,5±0,61 <sup>b</sup>	0,82±0,26 <sup>a</sup>	0,83±0,24 <sup>a</sup>
<b>TG (mg/dl)</b>	35,5±2,53 <sup>b</sup>	37,6±8,6 <sup>b</sup>	110,88±15,51 <sup>a</sup>	60,25±15,69 <sup>b</sup>

<sup>a, b, c</sup>: Differences between groups with different letters on the same line are important (P<0,05)

It was determined that the TP level was the highest in sheep milk, which was statistically significant (P <0.05). It was determined that the TP level decreased in buffalo, goat, and cow milk samples, respectively, but the difference between them was not statistically significant (P > 0.05). It was determined that the globulin level was the highest in sheep milk, which was statistically significant (P <0.05). Later, it was determined that the difference between the GLO levels in buffalo, cow, and goat milk samples was not statistically significant (P > 0.05). We determined that the highest ALB level was in sheep milk and goat, buffalo, and cow milk, respectively. It was determined that the difference between sheep and goat milk was not statistically significant (P > 0.05).

Albumin level was slightly higher in buffalo milk than cow milk, but this was not statistically significant (P > 0.05). TG level was statistically higher in goat milk samples (P <0.05) significantly. Later, it was found in buffalo, sheep, and cow milk samples, respectively. It was determined that the TG levels of cow and sheep milk samples were very close to each other (Figure 2). It was determined that the TC level was the highest in sheep milk, which was statistically significant (P <0.05). Afterward, it was determined that TC levels came from cow, buffalo, and goat milk, respectively (P <0.05).

**Some Mineral Levels in Milk Serum:** Average and standard errors values (mean ± SE) of Ca, Mg, Fe, Zn levels in goat, cow, sheep, and buffalo milk serum are presented in Table 2 and Figure 1.



**Figure 1.** Mineral values of different milk samples.

**Table 2.** Calcium (Ca), magnesium (Mg), iron (Fe), zinc (Zn) levels in the serum of cow, sheep, goat and buffalo milk.

	Cow milk	Sheep milk	Goat milk	Buffalo milk
Ca (mg/dl)	50,81±1,26 <sup>b</sup>	62,72±0,29 <sup>c</sup>	55,48±1,04 <sup>a</sup>	62,45±1,32 <sup>c</sup>
Mg (mg/dl)	9,18±0,29 <sup>b</sup>	13,89±0,54 <sup>c</sup>	10,67±0,29 <sup>a</sup>	13,29±0,28 <sup>c</sup>
Fe (µg/dl)	29,20±7,4 <sup>a</sup>	90,0±9 <sup>c</sup>	30,29±5,17 <sup>a</sup>	66,58±8,77 <sup>b</sup>
Zn(µg/dl)	158,74±15,82 <sup>ab</sup>	331,62±44,87 <sup>c</sup>	98,53±7,19 <sup>a</sup>	207,65±43,47 <sup>b</sup>

<sup>a, b, c</sup>: Differences between groups with different letters on the same line are important (P<0,05)

When the Ca level was compared in different milk samples, it was determined that the highest Ca level was found in sheep and buffalo milk. However, the difference between these two species was not statistically significant (P>0.05). It was determined that Ca levels decreased in goat and cow milk, respectively, and the difference between them was statistically significant (P <0.05). It was determined that the highest amount of Mg was found in buffalo, and sheep milk and the difference between their levels was not statistically significant (P>0.05). Mg levels were found to be decreased in goat's and cow's milk, respectively (P<0.05). The Fe level was statistically significant in sheep milk (P<0.05). It was determined that the Fe level was statistically significant in sheep milk (P<0.05). It was later determined that the Fe level was high in buffalo

milk (P <0.05), the Fe level was very close to each other in goat and cow milk, but the difference was not statistically significant between the two (P> 0.05). Zn level was statistically significantly higher in sheep milk (P> 0.05). It was determined that Zn level decreased in buffalo, cow and goat milk. It was determined that the difference between cow milk and goat and buffalo milk was not statistically significant (P> 0.05). In contrast the difference between goat and buffalo milk was statistically significant (P <0.05).

**α-S1-casein and β-lactoglobulin Levels in Milk Serum:** The average and standard error values (mean ± SE) of α-S1-casein and β-lactoglobulin levels in the serums of goat, cow, sheep, and buffalo milk are presented in Table 3.

**Table 3.** α-S1-casein and β-lactoglobulin levels in cow, sheep, goat and buffalo milk.

	α-S1-casein (µg/L)	β-lactoglobulin (µg/L)
Cow milk	1,40±0,089 <sup>b</sup>	23,19±2,84 <sup>b</sup>
Sheep milk	1,51±0,101 <sup>c</sup>	26,38±2,62 <sup>c</sup>
Goat milk	1,29±0,107 <sup>a</sup>	20,06±3,63 <sup>a</sup>
Buffalo milk	1,33±0,119 <sup>ab</sup>	22,34±3,29 <sup>ab</sup>

<sup>a, b, c</sup>: Differences between groups with different letters on the same column are important (P<0,05).

It was determined that the α-S1-casein fraction amount of casein was the highest in sheep milk (P<0.05). Later, it was determined that the level decreased in cow and buffalo milk, respectively, but the difference between them was not statistically significant (P>0.05). The lowest α-S1-casein level was found in goat's milk. It was determined that β-lactoglobulin level in different milk samples was highest in sheep milk, which was statistically significant (P<0.05). It was determined that β-lactoglobulin levels decreased in cow and buffalo milk samples, respectively, and the lowest level was in goat milk. It was determined that the difference between goat milk and buffalo milk was not significant (P>0.05), but the difference between

goat and sheep and cow milk was statistically significant (P <0.05).

## Discussion and Conclusion

Milk is considered one of the most important foods for humans. Consumption of dairy products containing probiotic bacteria or prebiotic components for these bacteria is common due to their delicious taste and positive physiological effects. (Yerlikaya, 2014). It has been reported that 85 % of world milk production is from cows, 11% from buffalo, 2.3% from goats, 1.4% from sheep, and 0.2% from camel milk (FAO, 2015).

The most crucial nutritional benefit of milk is its high protein content. Approximately 80% of the

protein contents of milk is casein, and 20% is serum proteins (Ambrosini et al., 1988). Serum proteins consist of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -lactoalbumin fractions. It has been reported that the amino acid sequence in all milk belonging to different species is very similar to each other (Hayam et al., 2017; Jandal, 1996) and those caseins are composed of casein proteins with slight changes in the relative proportions (Ono et al., 1989; Richardson et al., 1974). The levels of casein in milk vary between species. It has been reported that the amount of casein in milk (% w / w) was found in the highest sheep (4.6), followed by buffalo (3.6), goat (3), and the lowest amount in cow's milk (2.6) (Walstra et al., 2006). As a result of the dendrogram made with the  $\alpha$ -S1-casein amino acid sequence data in milk, it was reported that the mRNA gene sequence of bovine, buffalo, sheep, and goat milk were similar to each other but different in pigs, camels, horses and humans (Sukla et al., 2007). It has been reported that the amino acid sequence of the buffalo's cDNA is most similar to that of cattle (95.3 %), then goat (86.5 %), and sheep (84.5 %) (Sukla et al., 2007). Different milk proteins (e.g.  $\alpha$ -lactalbumin, serum albumin, lactoferrin) may cause allergic reactions. The casein fractions and  $\beta$ -lactoglobulin seems to be the most common milk allergens (El-Agamy, 2007).  $\beta$ -lactoglobulin is absent in human milk and has not been detected in camel and lama milk. It is present at relatively high concentrations in bovine, buffalo, sheep, goat milk, and horse and donkey milk. Compared to human and equine casein, ruminant casein (except for some goat milk) is relatively abundant with  $\alpha$ -S1-casein, which is assumed to be a predominant factor in the development of or sensitization to milk allergy (Barlowska et al., 2011; Malacarne et al., 2002; Potocnik et al., 2011). In our study, it was determined that the  $\alpha$ -S1-casein fraction amount of casein was at the highest level in sheep milk ( $P < 0.05$ ), then it was in cow and buffalo milk, respectively, on the other hand, the differences among them were not statistically significant ( $P > 0.05$ ). The lowest level of  $\alpha$ -S1-casein was found in goat milk.  $\alpha$ -S1-casein has been reported to be an essential allergen due to its IgE and T cell recognition reactions (Ruiter et al., 2007; Spuerger et al., 1996). Studies have reported that goat milk contains less  $\alpha$ -S1-casein than cow's milk (Clark and Shebron, 2000; Martin et al., 2002). Various studies have reported that low levels of  $\alpha$ -S1-casein in goat's milk reduce its allergenic effects (Bevilacqua et al., 2001). It is reported in the developed countries that, in the light of current trends preferring a healthy diet, the interest in goat milk and its derivatives, which are of particular importance with their quality, is increasing (Barrionuevo et al., 2002; Sampelayo et al., 2002).

Our research discovered that the highest level of  $\beta$ -lactoglobulin in different milk samples was found in sheep milk, which was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The  $\beta$ -lactoglobulin level was later determined in cow and buffalo milk samples, respectively, and the lowest in goat milk. It was determined that the differences between goat and buffalo milk were not significant ( $P > 0.05$ ), and the difference among goat, sheep, and cow milk was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The digestibility of individual milk proteins from different species differs as well. For example, horse  $\beta$ -lactoglobulin is more easy to digest than goat  $\beta$ -lactoglobulin (Inglingstad et al., 2010), and goat and sheep  $\beta$ -lactoglobulins are easier digestible than bovine  $\beta$ -lactoglobulin (Michaelidou, 2008; Uniacke-Lowe et al., 2010). Goat milk had the lowest level of  $\beta$ -lactoglobulin, followed by cow's milk, while sheep milk had the most significant level (Law, 1995; Ruprichova et al., 2014).

The TP level in sheep milk was statistically considerably higher ( $P < 0.05$ ). Later, it was determined that the TP level was found in buffalo, goat, and cow milk samples, respectively, and the difference among them was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). Parallel to our study, it has been reported that the TP content is the highest in sheep milk and then found in buffalo, goat, and cow milk, respectively (Borkova and Snalova, 2005; Guetouache et al., 2014; Gürsoy, 2015; Mahmood and Usman, 2010). In comparing of mountain and upland areas (Kedzierska-Matysek et al., 2015), significantly higher protein content in the raw milk obtained from the mountains was found. The high TP level in sheep milk provides advantages in the nutritional value of milk and the production of cheese, yogurt, butter, and casein. It can be said that the nutritional value of yogurt or cheese made from sheep's milk is higher than the other animal milk. However, this high TP level causes sheep milk to be more challenging to digest.

ALB and GLO levels were substantially greater in sheep milk than in other forms of milk in our investigation. The highest level of ALB was found in goat milk, followed by sheep's milk, buffalo, and cow's milk at the lowest level. It has been reported that high levels of ALB cause low digestibility and, if consumed too much, may cause digestive system problems. The GLO level in goat milk was found to be at the lowest level in our investigation. GLO deficiency in the body causes the immune system to weaken and susceptibility to acute or chronic diseases. GLO plays a vital role in fighting antigens in the body and removing toxins. For this reason, it is essential to have an adequate level in the body. In our study, it was determined that the highest GLO level was found in sheep milk. Experts also

recommend that people with some stomach and intestinal diseases should not consume products made with sheep's milk. The A/G ratio is critical in clinical pathology for classifying electrophoretic profiles and detecting dysproteinemia (Kaneko, 1997). It was determined that the milk with the highest ALB / GLO ratio was goat milk. It was determined that the milk with the highest ALB / GLO ratio was goat milk.

The level of TG in goat milk was found to be the highest in our investigation ( $P < 0.05$ ), followed by buffalo, sheep, and goat milk, respectively. In parallel with our study, it has been reported that the fatty acids in goat milk constitute 15-18% of the total fatty acids, and this ratio is approximately 5-9% in cow milk (Park et al., 2007). Compared to cow's milk, butyric, myristic, palmitic, and linoleic acid content in goat milk is higher, but stearic and oleic acid content is reported to be lower (Haenlein, 2004). On the other hand, it is reported in the literature that goat and sheep's milk oils contain low butyric acid but high levels of caproic, caprylic, and capric acid (Walstra et al., 2006).

Cholesterol is mainly linked to cardiovascular illness, but it is also found in body cell membranes and the central nervous system (Dietschy Turley, 2004; Gidding et al., 2006). Although the results are not conclusive, it has been proposed that human milk cholesterol is responsible for the long-term regulation of cholesterol metabolism and myelin formation. (Gidding et al., 2006; Schanler, 2011). The TC level in sheep milk was the highest, which was statistically significant. Following that, it was discovered that TC levels were derived from cow, buffalo, and goat milk, respectively ( $P < 0.05$ ). Ca levels were highest in sheep and buffalo milk, followed by goat and cow milk, respectively. Parallel to our research, it was shown that sheep milk had the highest concentration of Ca, followed by goat and cow milk. In our research, the Mg levels in sheep and buffalo milk were shown to be the highest (Balthazar et al., 2017). Hayam et al. (2017) reported that Ca was the highest in sheep milk and buffalo, cow, and goat milk, respectively. In another study conducted by Raynal-Ljutovac (2007), the calcium ratios of human, goat, and sheep milk were compared. Similar to our research, sheep milk was higher in terms of Ca ratio than other milk. The bioavailability of minerals in sheep milk ensures that sheep milk is a valuable source of these elements. It has been reported that Ca, which is bound to casein in both organic and mineral forms, has an important use in the milk digestion process (Gueguen and Pointillart, 2000). In our research, the Mg levels in sheep and buffalo milk were shown to be the highest. It was later discovered that it was found at the lowest levels in goat and cow milk,

respectively. In a study conducted concurrently with ours, the highest Mg levels were discovered in sheep milk, followed by goat and cow milk, respectively (Balthazar et al., 2017). The Mg content of cow milk is determined in the range of 100 to 150 mg dm<sup>-3</sup>. Mg concentrations are correlated with the calcium content of milk (Micinski et al., 2013). Taking Mg into the body at regular intervals plays a vital role. Although the distributions of calcium, phosphorus, and magnesium in the soluble and colloidal phases of milk are similar for cow and goat milk, sheep milk differs from them because it has lower solubility (Hilali et al., 2011). In the study conducted by Hayam et al. (2017) in Egypt, it was reported that the highest Mg content was determined in buffalo milk, followed by sheep, cow, and goat milk.

Our research discovered that sheep milk had the highest Fe level, followed by buffalos, goat, and cow milk. It was determined that the difference between the Fe levels of sheep and buffalo milk was significant ( $P < 0.05$ ), but the difference in Fe levels between cow and goat milk was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). A study reported that the amount of Fe was highest in sheep and cow milk, while the lowest was found in goat milk (Balthazar et al., 2017). In another study, it was determined that the bioavailability of Fe was higher in goat's milk than cow's milk (Raynal-Ljutovac et al., 2008). This result could be related to the higher amount of nucleotides in the intestines, ensuring better absorption.

Zn level in sheep milk was statistically significantly higher in our study ( $P < 0.05$ ). According to the findings, this was followed by buffalos, cow, and goat milk. Sheep milk had the greatest Zn concentration in studies conducted concurrently with our investigation, and cow and goat milk had similar values (Balthazar et al., 2017; Hayam et al., 2017). Another study reported that Anglo-Nubian goat milk contains significantly higher amounts of Cu and Zn than French Alpine goat milk (Park, 2007). In zinc deficiency, symptoms such as growth retardation (dwarfism), delayed development of the sex organs, lack of resistance to diseases, delayed healing of wounds, disorders in taste and smell perception are observed (Raynal-Ljutovac, 2008).

It was concluded that  $\alpha$ -S1-casein and  $\beta$ -lactoglobulin levels in goat milk are lower than in other milk samples (cow, sheep, and buffalo), and it can be recommended for those with milk allergies.

### Acknowledgments

It was presented as a summary paper at the II. International Conference on Veterinary Biochemistry & Clinical Biochemistry, ANKARA

Congress (2019) and summarized from the author's master's thesis with the same name.

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

### Ethical Approval

This study is not subject to HADYEK's permission in accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees".

### Funding

This research was supported by the Scientific Research Projects Commission of Ondokuz Mayıs University as a master thesis project (Contract Major Number: PYO.VET1904.19.003).

### Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 14% as stated in the report uploaded to the system.

### Author Contributions

Motivation / Concept: GÇ  
 Design: GÇ  
 Control/Supervision: GÇ  
 Data Collection and / or Processing: TAŞ  
 Analysis and / or Interpretation: GÇ, TAŞ  
 Literature Review: TAŞ  
 Writing the Article: GÇ, TAŞ  
 Critical Review: GÇ

### References

- Balthazar CF, Silva HLA, Esmerino EA, Rocha RS, Moraes J, Carmo MAV, Azevedo L, Camps I, Abud YKD, Sant AC, Franco RM, Freitas MQ, Silva MC, Raices RSL, Escher GB, Granato D, Ranadheera CS, Nazzaro F, Cruz AG, 2017: The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. *Food Chem*, 25 (246), 464-472.
- Barłowska J, Szwałowska M, Nczuk LZ, Krol J, 2011: Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production, *Comprehen Rev Food Sci Food Safe*, 10, 291-302.
- Barbour HM, Davisdon W, 1988: Studies on measurement of plasma magnesium: application of the Magon dye method to the Monarch centrifugal analyzer. *Clin Chem*, 34 (10), 2103-2105.
- Barrionuevo M, Alferez MJM, Aliaga LMMR, Sampelayo SMR, Campos MS, 2002: Beneficial effect of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome. *J Dairy Sci*, 85, 657-664.
- Bauman DE, Griinari JM, 2003: Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu Rev Nutr*, 23, 203-227.
- Bequette BJ, Backwell FRC, Crompton LA, 1998: Current concepts of amino acid and protein metabolism in the mammary gland of the lactating ruminant. *J Dairy Sci*, 18, 2540-2559.
- Bevilacqua C, Martin P, Candalh C, Fauquant J, Piot M, Roucayrol AM, Pilla F, Heyman M, 2001: Goats' milk of defective alpha(s1)-casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to beta-lactoglobulin in guinea pigs. *J Dairy Res*, 68 (2), 217-227.
- Bucola GH, David H, 1973: Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Chin Chem*, 19, 476-482.
- Borkova M, Snašlová J, 2005: Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review. *Czech J Food Sci*, 23, 41-50.
- Bucola GH, David H, 1973: Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Chin Chem*, 19, 476-482.
- Burks AW, 1999: Childhood Food allergy. *Immunol Allergy Clin N Amer*, 19, 397-406.
- Charkoftaki G, Kytariolos J, Macheras P, 2010: Novel milk-based oral formulations: proof of concept. *Int J Pharmacol*, 390, 150-159.
- Chen FM, Yang JH, Lin TL, Wang CL, Yu HH, Chiang BL, 2014: Analysis of  $\alpha$ -lactalbumin-,  $\beta$ -lactoglobulin-, and casein-specific IgE among children with atopic diseases in a tertiary medical in Northern Taiwan. *Immunol Infect*, 47, 130-136.
- Clark S, Sherbon JW, 2000: Alpha-S1-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Rum Res*, 38, 123-134.
- DeWit JN, 1998: Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J Dairy Sci*, 81, 599-608.
- Dietschy JM, Turley SD, 2004: Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res*, 45, 1375-1397.
- El Agamy EI, 2007: The challenge of cow milk protein allergy, *Small Rum Res*, 68, 64-72.
- Exl BM, 2001: Frische, R. Cow's milk protein allergy and possible means for its prevention, *Nutrition*, 17, 642-651.
- FAO, 2010: FAOSTAT: Statistics division. food and agriculture organization of the United Nations, Available from: Accessed 2021 July 31.
- Fontecha J, Lozada L, Martínez-Castro I, Juárez M, 2000: Composition of the sterol fraction of caprine milk fat by gas chromatography and mass spectrometry. *J Dairy Res*, 67(3), 437-441.
- Fossati PL, Prencipe L, 1982: Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*, 28, 2077-2080.

- Fox PF, Mcsweeney PLH, 1998: Dairy Chemistry and Biochemistry, Blackie Academic and Professional, Second Edition, Ireland, University College, 1-19.
- Fukuda K 2013: Camel milk. In Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health, Wiley Online Library: Hoboken, NJ, USA, 578-593.
- Gidding SS, Dennison BA, Birch LL, Daniels SR, Gilman MW, Lichtenstein AH, Thomas RK, Julia S, Nicolas S, Linda Van H, 2006: Dietary recommendations for children and adolescents: a guide for practitioners, *Pediatrics*, 117, 544e559.
- Giray H, 2004: Anne sütü ile beslenme. *TTB Sür Tıp Eğitimi Derg*, 13(1), 12-15.
- Goff HD, 2016: Introduction to dairy science and technology: milk history, consumption, production, and composition. In: The Dairy Science and Technology eBook. Guelph, Canada: University of Guelph.
- Grant GH, Kachmar JF, 1976: The proteins of body fluids. *Fund Clin Chemistry*, 1, 4.
- Grummer RR, 1991: Effect of feed on the composition of milk fat. *J Dairy Sci*, 74, 3244-3257.
- Gueguen LA, Pointillart A, 2000: The bioavailability of dietary calcium. *J Amer Coll Nutr*, 19, 119-136.
- Guetouache M, Guessas B, Medjekal S, 2014: Composition and nutritional value of raw milk. *Issue Biol Sci Pharmaceut*, 2, 115-122.
- Gürsoy A, 2015: Süt kimyası ve biyokimyası, 1. Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 1-64.
- Haenlein GFW, 2004: Goat milk in human nutrition. *Small Rum Res*, 51, 155-163.
- Harvatine KJ, Boisclair YR, Bauman DE, 2009: Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal*, 3(1), 40-54.
- Hayam MA, Afaf OA, Jihan MK, Wafaa MZ, 2017: Evaluation of different types of Egyptian milk from biochemical aspects. *Int J Dairy Sci*, 12 (2), 130-136.
- Hilali M, El-Mayda E, Rischkowsky B, Hunter GJE, 2011: Milk protein properties. *J Dairy Res*, 17, 79-90.
- Inglingstad R, Devold T, Eriksen E, Holm H, Jacobsen M, Liland K, Rukke EO, Vegarud GE, 2010: Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human milk by human gastrointestinal enzymes. *Dairy Sci Technol*, 90, 549-563.
- Jain M, 1998: Dairy foods, dairy fats, and cancer: A review. *Epidemiol Evid*, 18 (5), 905-937.
- Jandal JM, 1996: Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Rum Res*, 22, 177-185.
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, 1997: Serum proteins and the dysproteinemias. In: Clinical biochemistry of domestic animals, ed, Academic Press, San Diego, CA 885-905.
- Kedzierska-Matysek M, Barłowska J, Litwinczuk Z, Koperska N, 2015: Content of macro- and microelements in goat milk in relation to the lactation stage and region of production. *J Elementol*, 20 (1), 107-114.
- Law AJ, 1995: Changes in casein composition of goats' milk during the course of lactation: physiological inferences and technological implications. *J Dairy Res*, 62 (3), 431-439.
- Mahmood A, Usman S, 2010: A comparative study on the physicochemical parameters of milk samples collected from buffalo, cow, goat and sheep of Gujrat. *Pak J Nutr*, 9, 1192-1197.
- Makino T, Siato M, Horiguchi D, Kina KA, 1982: Highly sensitive colorimetric determination of serum zinc using water- soluble pyridylazo dye. *Clin Acta*, 120, 127-135.
- Malacarne M, Martuzzi F, Summer A, Mariani P, 2002: Review: protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk, *Int Dairy J*, 12, 869-877.
- Martin P, Szymanowska M, Zwierzchowski ML, Leroux LC, 2002: The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milk. *Reproduct Nutr Devel*, 42, 433-459.
- Masoodi TA, Shafi G, 2010: Analysis of casein alpha S1 & S2 proteins from different mammalian species. *Bioinform*, 31, 4 (9), 430-435.
- Michaelidou AM, 2008: Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. *Small Rum Res*, 79, 42-50.
- Michaylova V, Illkova PP, 1971: The liquid-state, iodide-selective electrode. *Anal Chim Acta*, 53, 194.
- Micinski J, Zwierzchowski GIM, Kowalski IMJ, Szarek J, 2013: Health-promoting properties of selected milk components. *J Elementol*, 18 (1), 165-186.
- Nogalska A, Momot M, Sobczuk-Szul M, Pogorzelska-Przybytek P, Nogalski Z, 2017: Calcium and magnesium contents in the milk of high-yielding cows. *J Elementol*, 22(3), 809-815.
- Ono T, 1989: Milk casein as molecular assembly. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 34 (11), 1351-1358.
- Önür ZY, 2015: Keçi ve koyun sütlerinin kimyasal bileşenleri. *Gıda*, 40, 1-40.
- Özkan B, 2002. Pastörize sütün A ve D vitamin kayıplarının incelenmesi ve A-D vitaminlerince zenginleştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Öztürk M, 2008: Besler T. Besin alerjileri. 1. Baskı. Klasmat Yayınevi, Ankara, 8-10.
- Park YW, Juarez M, Ramos M, Haenlein GFW, 2007: Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rum Res*, 68, 88-113.
- Pessato TB, De Carvalho NC, Tavano OL, Fernandes LGR, Zollner RDL, Netto FM, 2016: Whey protein isolate hydrolysates obtained with free and immobilized alcalase: Characterization and detection of residual allergens. *Food Res Int*, 83, 112-120.
- Potocnik K, Gantner V, Kuterovac K, Cividini A, 2011: Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo*, 61, 107-113.
- Raynal-Ljutovac K, Lagriffoul G, Paccard G, Guillet P, Chilliard I, 2008: Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Rum Res*, 79, 57-72.
- Raynal-Ljutovac K, Park YW, Gaucheron F, Bouhallab S, 2007: Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Rum Res*, 68, 207-220.
- Richardson TE, Willey J, Nov M, 1974: Continuous and discrete theories of detection and recognition. *Brit J Math Stat Psychol*, 1, 10.

- Ruiter B, Knol EF, Van RJ, Neerven RJ, Garssen J, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst AC, Van Hoffen E, 2007: Maintenance of tolerance to cow's milk in atopic individuals is characterized by high levels of specific immunoglobulin G4. *Clin Exp Allergy*, 37(7), 1103-1110.
- Ruprichova L, Kralova M, Borkovcova I, Vorlova L, 2014: Determination of whey proteins in different types of milk. *Acta Vet Brno*, 83(1), 67-72.
- Saarinen KM, Juntunen-Backman K, Jarvenpaa AL, 1999: Supplementary feeding in maternity hospitals and the risk of cow's milk allergy: A prospective study of 6209 infants. *J Allerg Clin Immunol*, 1, 457-461.
- Sacks H, 1999: Max Weber's Ancient Judaism Theory. *Cult Soc*, 16(1), 1-29.
- Sampelayo S, Barrionuevo M, Alferez MJ, Lopez AI, Campos MS, 2002: Beneficial effect of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome. *J Dairy Sci*, 85(3), 657-664.
- Schanler RJ, 2011: Outcomes of human milk-fed premature infants. *Sem Perinatol*, 35, 29-33.
- Spuergin P, Mueller H, Walter M, Schiltz E, Forster J, 1996: Allergenic epitopes of bovine alpha S1-casein recognized by human IgE and IgG. *Allergy*, 51(5), 306-312.
- Stookey L, 1970: Two new spectrophotometric reagents for copper. *Talanta*, 17(7), 644-647.
- Sukla S, Bhattacharya TK, Venkatachalapathy RT, Kumar P, Sharma A, 2007: Molecular cloning and characterization of buffalo alpha(s1)-casein gene. *DNA Seq*, 18(5), 334-340.
- Uniacke-Lowe T, Huppertz T, Fox PF, 2010: Equine milk proteins: chemistry, structure and nutritional significance. *Int Dairy J*, 20, 609-629.
- Varma SN, Schwarz V, Naomi Simpson IM, 1962: The role of dietary lactose in the synthesis of brain galactolipids. *Biochem J Dec*, 85(3), 546-549.
- Wal JM, 2002: Cow's milk proteins/allergens, *Ann Aller Asthma Immunol*, 89, 3-10.
- Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ, 2006: Dairy Science and Technology, 3rd ed., FL, Taylor& Francis Group, 763.
- Weekes NY, Lewis RS, Patel FR, Chang DJ, Berger D, Lupien SJ, 2006: Examination stress as an ecological inducer of sex differences in cortisol. *Stress*, 9, 199-206.
- Weichselbaum T, 1946: An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Am J Clin Path*, 16, 40-49.
- Weinberg RF, Hodkiewicz P, Groves DI, 2004: What controls gold distribution in the Archean? *Geol*, 32, 545-548.
- Yerlikaya O, 2014: Starter cultures used in probiotic dairy product preparations and popular probiotic dairy drinks. *Food Sci Technol*, 34, 221-229.
- \*It was presented as a summary paper at the II. International Conference on Veterinary Biochemistry & Clinical Biochemistry Congress, ANKARA (2019) summarized from the first author's master's thesis with the same name.
- \*\*Correspondence:** Gülay CİFTÇİ, University of Ondokuz Mayıs, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, 55220 Atakum, Samsun, Turkey.  
**e-mail:** gciftci@omu.edu.tr



## Etlik Piliçlerde Işık Şiddeti ve Tüneğin Korku ve Stres Reaksiyonları ile Bazı Et Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi

Evrin DERELİ FİDAN<sup>1,a,\*</sup>, Erdi Ziya OKUR<sup>1,b</sup>

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye.  
<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-9805-6162, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0003-0963-781X

Geliş Tarihi: 29.12.2021

Kabul Tarihi: 10.03.2022

**Özet:** Bu çalışmada, ışık şiddeti ve tünek kullanımının etlik piliçlerde korku ve stres reaksiyonları ile bazı et kalite özellikleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada, 3 farklı ışık şiddetine (5, 20 ve 80 lüks) göre üç grup, tünek kullanımına (tünek var ve yok) göre iki grup ve her grupta da üç tekerrür grubu olmak üzere toplam 270 adet etlik piliç kullanılmıştır. Araştırmada, etlik piliçlerde hareketsiz kalma süresi ile L\* (parlaklık), a\* (kırmızılık) ve b\* (sarılık) renk özellikleri üzerine ışık şiddeti ve tünek kullanımının etkisi istatistiksel bakımdan önemsiz bulunmuştur. Heterofil/lenfosit oranı üzerine ışık şiddeti bakımından gruplar arasındaki fark önemli (P<0,01) bulunurken; tünek kullanımının etkisi önemsiz bulunmuştur (P>0,05). Et kalite özelliklerinden pH<sub>15</sub> değeri 5, 20 ve 80 lükste sırasıyla 6,04, 5,97 ve 5,92 olarak saptanmıştır (P<0,05). Pişirme kaybı üzerine tünek kullanımının etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunurken; ışık şiddetinin etkisi ise önemli bulunmuştur (P<0,001). Araştırma sonunda, ışık şiddetinin ve tünek uygulamasının su tutma kapasitesi üzerine etkisinin önemli (sırasıyla P<0,05 ve P<0,001) olduğu gözlemlenmiştir. Etlik piliçlerde 20 lüks ışık şiddeti kullanımının heterofil/lenfosit oranı ve pişirme kaybını düşürdüğü ve bu durumun hayvanların refahını olumlu yönde etkilediği görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Et kalite özellikleri, Etlik piliç, Işık şiddeti, Refah, Stres, Tünek.

### Effect of Light Intensity and Perch on Fear and Stress Reactions and Some Meat Quality Characteristics in Broilers

**Abstract:** The present study aimed to determine the effect of light intensity and perch use of broiler on fear and stress reactions and some meat quality characteristics in broilers. A total of 270 one-day-old male broiler chicks were randomly assigned to groups based on the three different light intensity (5, 20, and 80 lux) and perch use (perch and no perch) with three replicates. In the study, it has been determined that there was statistically no significant difference between light intensity and perch on tonic immobility duration, L\* (lightness), a\* (redness), and b\* (yellowness) color traits. While the difference between the groups of light intensity was significant (P<0.01), the effect of perch was not significant on heterophil/lymphocyte ratio (P>0.05). pH<sub>15</sub> value from meat quality characteristics was detected as 6,04, 5,97, and 5,92 at 5, 20 and 80 lux respectively (P<0.05). While the effect of perch use was not significant, light intensity was significant on cooking loss (P<0.001). At the end of the study, it is indicated that a significant effect of light intensity and perch on water holding capacity from meat quality traits (respectively, P<0.05 and P<0.001). It has been observed that the use of 20 lux light intensity in broilers reduces the heterophile/lymphocyte ratio and cooking loss, and this situation positively affects the welfare of the animals.

**Keywords:** Broiler, Light intensity, Meat quality, Perch, Stress, Welfare.

### Giriş

Etlik piliç yetiştiriciliğinde bakım-yönetim uygulamaları genellikle sabit olmakla birlikte, ışık şiddeti ve tünek kullanımı etlik piliç refahının kontrol altına alınması ve olumlu yönde geliştirilmesi amacıyla kullanılabilir önemli faktörlerdir. Korku, etlik piliçlerin refahını bozan önemli bir davranış şekli olup; piliçlerin korku seviyesinin belirlenmesinde hareketsiz kalma (tonik immobilité; TI) süresi en çok kullanılan yöntemdir (Anderson ve ark., 2021). Kanatlıların stres durumu altında göstermiş oldukları fizyolojik cevabın güvenilir bir ölçütü olarak H/L oranı (Gross ve Siegel, 1993) kullanılmaktadır. Alvino ve ark. (2009), loş ışık (düşük ışık şiddeti) altında yetiştirilen etlik piliçlerde

hareketsiz kalma süresinin arttığını ve bunun korku durumunun artmasına yol açtığını belirtmişlerdir. Dereli Fidan ve ark. (2017a), H/L oranını 20 lüks grubundaki piliçlerde (0,30) loş ışık grubuna (0,15) göre daha yüksek bulmuşlardır.

Etlik piliç yetiştiriciliğinde, çevresel zenginleştirme yönünden hayvan refahı üzerine etkili faktörlerden birisi de kümeslere farklı tip ve şekillerde yerleştirilen tüneklerdir. Campo ve ark. (2005) tünek kullanılan gruptaki tavuklarda H/L oranının önemli düzeyde düştüğünü ve TI süresinin de uzadığını belirtmişlerdir. Kesim öncesi piliçlerin maruz kaldıkları akut ya da kronik stres etkenlerinin dolaşımdaki kortikosteron düzeyini artırabileceği ve

bu durumun kesim sonrası et kalite özellikleri ve kas metabolizması üzerine önemli etkilerinin gözlemlenebileceği belirtilmiştir (Güler, 2011).

Bu araştırma, etlik piliçlerde yetiştirme koşullarından ışık şiddeti ve tüneğin korku ve stres göstergeleri ile bazı et kalite özellikleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla düzenlenmiştir.

## Materyal ve Metot

Araştırma, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Kanatlı Araştırma Birimi'nde yürütülmüş olup, çalışmanın süresi 42 gün şeklinde düzenlenmiştir. Çalışmanın yürütülebilmesi Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (30.07.2019 tarih ve 64583101/2019/075 sayılı) izin alınmıştır.

**DeneySEL Tasarım:** Çalışmada, özel bir kuluçkahaneden alınan bir günlük yaşta ve canlı ağırlık ortalaması 45,87-47,68 g arasında toplam 270 adet erkek ticari etlik civciv (Ross 308) kullanılmıştır. Civcivler ışık şiddetine göre üç grup (5, 20 ve 80 lüks) tünek kullanımına göre iki grup (tünek var ve tünek yok) ve her bir gruba ait üç tekerrür grubu olacak şekilde ayrılmıştır. Araştırmanın deneme deseni 3x2x3=18 bölme şeklinde planlanmıştır.

**Bakım ve Besleme:** Araştırmada sıcaklık, havalandırma ve ışık bakımından kontrol edilebilen aynı koşullara sahip olan toplamda üç oda kullanılmıştır. Civcivler çevre kontrolü olan bu odalarda 110x150 cm boyutlarında ve 1 m<sup>2</sup> serbest gezinti alanı olan talaş altlıklı yer bölmelerinde barındırılmışlardır. Piliçler, ilk yedi gün maksimum (23A:1K) ışık süresine ve 30 lüks ışık şiddeti altında yetiştirilmişlerdir. Tüm gruplarda aydınlatma programı, 5, 20 ve 80 lüks ışık şiddeti uygulamaları altında, 8-36. günlerde 18A:6K, takip eden diğer günlerden kesime kadar olan dönemde (37-42. günler) ise yeniden 23A:1K şeklinde uygulanmıştır (EU, 2007).

Odalarda aydınlatma, sarı renk halojen ampuller ile dijital zaman saati tarafından kontrolü sağlanarak yapılmıştır. Haftada üç kere lüksmetre (Extech HD 450, USA) ile reosta ayarı sağlanarak, ışık şiddeti ölçümü yapılmıştır. Deneme odalarının sıcaklığı, ilk üç gün 33 °C olacak şekilde ayarlanmış olup, izleyen günlerde her hafta 3 °C aşamalı olarak azaltılarak deneme sonu olan 42. güne kadar 22±1 °C'ye düşürülmüştür. Nispi nem oranı % 50-60 değerleri arasında tutulmuştur. Standart bakım-besleme yapılan etlik piliçlere, etlik civciv başlangıç yemi (0-10. günler arasında; 3050 kcal ME/kg-%23 ham protein), etlik civciv yemi (11-24. günler arasında; 3150 kcal ME/kg-%22 ham protein;), etlik piliç yemi (25-42. günler arasında; 3200 kcal ME/kg-%20 ham protein) verilmiştir. Piliçlerin yem ve su

ihtiyaçları *ad libitum* olarak sağlanmıştır. Tünekler, suluk ve yemlik arasına yerleştirilmiştir. Araştırmada, 3 cm dış çaplı düz metal borulardan yapılan tünekler altlığın hemen üstünden başlayacak şekilde 5 cm (0-21. günlerde) ve 10 cm (22-42. günlerde) yükseklikte kullanılmıştır.

**Verilerin Elde Edilmesi:** TI süresi verilerinin değerlendirilmesi için örnek büyüklüğü, etki genişliği (effect size) = 0.40 test gücü (1-β) = 0.95 olan tekrarlayan ölçümler için Power Analizi'nde (Faul ve ark., 2007) belirlenmiştir. TI süresi ölçümü için toplam 90 piliçlik bir örneklem büyüklüğü yeterli bulunmuştur (α error = 0.05, critical F = 2.32, actual power = 0.95).

Araştırmada 40. günde, TI süresi ölçümü için her gruptan 15 piliç rastgele seçilmiştir. TI testi için, loş, sessiz bir odada, hayvanlar sternumları üzerine elimiz ile hafifçe bastırarak sırt üstü yatırılarak 15 saniye süreyle hareketsiz bırakılmış ardından piliçlerin kendi kendilerine doğruluncaya kadar geçen süre ölçülmüştür. TI testinde piliçlerin 10 dakika süre içerisinde tepki vermedikleri hallerde ise 600 s en yüksek skor olarak kaydedilmiştir (Jones ve Faure, 1980).

42. günde TI testi uygulamasına seçilmeyen piliçlerden her gruptan 21 piliç rastgele seçim yapılarak, H/L oranı ve bazı et kalite özellikleri yönünden incelenmişlerdir. H/L oranının belirlenmesi için, piliçlerin kanat altı venasından (*vena ulnaris*) 1 ml kan numunesi EDTA'lı tüplere alınmış ve bu numunelerden hazırlanan frotiler May-Grünwald Giemsa boya kullanılarak boyandıktan sonra her bir preparatta toplam 100 hücre sayılmıştır. Heterofil sayısı lenfosit sayısına oranlanarak H/L oranı hesaplanmıştır. (Gross ve Siegel, 1993).

Et kalite özellikleri olarak sol göğüs eti (*musculus pectoralis major*) pH, renk, pişirme kaybı ve su tutma kapasitesi değerleri belirlenmiştir. Göğüs eti pH'sı, kesim sonrası 15. dakikada (pH<sub>15</sub>) sıcak karkastan ve karkaslar +4 °C'de 24 saat soğutulduktan sonra (pH<sub>u</sub>) soğuk karkastan, cam elektrotlu bir pH metre (Hanna Instrument, HI 9124) elektrotunun (Hanna FC-200) kas içine direkt yerleştirilmesiyle, üç farklı bölgeden ölçülmüştür. Göğüs etinin üç farklı değer ortalaması sonucu elde edilen değer, pH değerini oluşturmuştur. Et rengi ölçümünde L\*, a\* ve b\* koordinat sistemine göre çalışma prensibi bulunan renk ölçüm aletinden yararlanılmıştır (Minolta CR-400, Ramsey, NJ). Bu ölçüm sisteminde L\*; parlaklık, a\*; kırmızılık ve b\*; sarılık renk indekslerini göstermektedir. Pişirme kaybını belirlemek için göğüs etinden yaklaşık 20 g kadar alınan et örnekleri tartıldıktan vakum poşetlerine konulmuş ve vakumlanmıştır. Vakumlanan örnekler, 4 °C'de 24 saat dinlendirilmiş ve sonrasında su banyosunda (85 °C) 45 dakika

pişirilmiştir. Pişirme öncesi ve sonrası et örnekleri ağırlıkları arasındaki farkın başlangıç et örneği ağırlığına oranlanarak pişirme kaybı (%) hesaplanmıştır (Honikel, 1998). Göğüs eti su tutma kapasitesi ölçümünde Dereli Fidan ve ark. (2020a) tarafından bildirilen metod kullanılmıştır.

**İstatistik Analizler:** Verilerde istatistik analizler SPSS 22.0 paket programıyla yapılmıştır. H/L oranı, TI süresi ile et kalite özellikleri bakımından ışık şiddeti ve tüneğ faktörlerinin etki durumlarını ortaya koymak için Genel Doğrusal Model (GLM) yönteminden yararlanılmıştır. Gruplar arası farkların önem kontrolünde Duncan testi kullanılmıştır (Snedecor ve Cochran, 1989).

## Bulgular

Araştırmada 20 lüks ışık şiddeti grubunda TI süresi (121,07 s), 5 ve 80 lüks ışık şiddeti gruplarına göre (sırasıyla 83,57 ve 107,97 s) daha yüksek değerde tespit edilmesine rağmen, ışık şiddetinin TI süresi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulundu (Tablo 1). Işık şiddetinin 20 lüks uygulandığı grupta H/L oranı (0,25), şiddetin 5 ve 80 lüks uygulandığı gruplardan daha düşük (sırasıyla 0,39 ve 0,37) saptandı. Işık şiddetinin H/L oranı üzerine etkisi istatistiksel bakımdan önemli ( $P < 0,01$ ) bulunurken, tüneğin H/L oranı üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur (Tablo 1). Işık şiddeti ve

**Tablo 1.** Işık şiddeti ve tüneğ kullanım durumunun TI süresi ve H/L oranına etkisi.

Faktörler	TI süresi (s)			H/L oranı		
	n	$\bar{X}$	$s_x$	n	$\bar{X}$	$s_x$
<b>Beklenen Ortalama Işık Şiddeti (lüks)</b>	90	104,17	10,27	126	0,34	0,02
5	30	83,57	17,78	42	0,39 <sup>a</sup>	0,03
20	30	121,07	17,78	42	0,25 <sup>b</sup>	0,03
80	30	107,97	17,78	42	0,37 <sup>a</sup>	0,03
<b>Tüneğ Durumu</b>						
Var	45	102,22	14,52	63	0,31	0,02
Yok	45	100,11	14,52	63	0,36	0,02
<b>ANOVA</b>				<b>P değeri</b>		
<b>Işık Şiddeti (IŞ)</b>		0,323			0,005	
<b>Tüneğ (T)</b>		0,694			0,202	
<b>IŞ x T</b>		0,888			0,584	

<sup>a, b</sup>: Aynı sütunda farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir.

**Tablo 2.** Göğüs eti kalite özelliklerine ilişkin en küçük kareler ortalamaları ve standart hataları.

Faktörler	Göğüs eti kalite özellikleri						
	pH <sub>15</sub>	pH <sub>u</sub>	L*	a*	b*	Pişirme kaybı (%)	Su tutma kapasitesi (%)
Beklenen ortalama ( $\mu$ )	5,98	5,51	58,03	2,42	15,81	22,17	11,52
<b>Işık Şiddeti (lüks)</b>							
5	6,04 <sup>a</sup>	5,49	57,48	2,31	16,04	22,35 <sup>a</sup>	10,86 <sup>b</sup>
20	5,97 <sup>a,b</sup>	5,53	58,78	2,12	16,08	20,44 <sup>b</sup>	11,22 <sup>a,b</sup>
80	5,92 <sup>b</sup>	5,52	57,83	2,84	15,31	23,72 <sup>a</sup>	12,50 <sup>a</sup>
<b>Tüneğ Durumu</b>							
Var	5,97	5,51	58,15	2,71	15,88	22,17	12,45 <sup>b</sup>
Yok	5,98	5,52	57,91	2,14	15,74	22,16	10,60 <sup>a</sup>
$s_x$	0,02	0,02	0,080	0,16	0,20	0,30	0,27
<b>ANOVA</b>					<b>P değeri</b>		
<b>Işık Şiddeti (IŞ)</b>	0,035	0,594	0,791	0,154	0,218	<0,001	0,036
<b>Tüneğ (T)</b>	0,723	0,769	0,880	0,070	0,715	0,994	0,001
<b>IŞ x T</b>	0,421	0,775	0,731	0,063	0,142	0,287	0,071

<sup>1</sup>: Beklenen ortalamaların standart hatası, <sup>a, b</sup>: Aynı sütunda farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir.

tüneğin et kalite özellikleri üzerine etkileri Tablo 2'de verilmiştir. Işık şiddeti grupları arasında en düşük pH<sub>15</sub> değeri (5,92) 80 lüks ışık şiddeti

grubunda en yüksek pH<sub>15</sub> değeri (6,04) ise 5 lüks ışık şiddeti grubunda elde edildi ( $P < 0,05$ ). Et kalite özelliklerinden pişirme kaybı 5, 20 ve 80 lüks ışık

şiddeti gruplarındaki piliçlerde sırasıyla % 42,44, % 34,99 ve % 40,11 olarak tespit edildi. Işık şiddetinin pişirme kaybı üzerine olan etkisi istatistiksel açıdan önemli ( $P<0,001$ ) bulundu. Göğüs etinin su tutma kapasitesi tünek kullanılan grupta %10,60 olan bu oran tünek kullanılmayan grupta %12,45 olarak saptandı. Işık şiddeti ile tünek interaksiyonunun pişirme kaybı oranı üzerinde istatistiksel bakımdan önemli bir etkisi bulundu ( $P<0,05$ ).

## Tartışma ve Sonuç

Araştırmada, istatistiksel önemde olmasa da, en kısa TI süresi 83,57 s ile 5 lüks ışık şiddetinde yetiştirilen piliçlerde, en uzun TI süresi ise 121,07 s ile 20 lüks ışık şiddeti grubunda görülmüştür. Bu sonuçlar ile uyumlu olarak, Olenrewaju ve ark. (2010) (0,5, 1,0, 20 lüks), Olanrewaju ve ark. (2015) (0,5, 5, 10 lüks), Dereli Fidan ve ark. (2017b), (5 ve 20 lüks) ışık şiddetinin TI süresi üzerine istatistiksel önemde olmadığını bildirmişlerdir. Tünek kullanımının TI süresi üzerine etkisinin istatistiksel bakımdan önemsiz bulunma, konuyla ilgili olarak benzer yaklaşım ile yürütülen bazı araştırma sonuçları (Ventura, 2009; Karaarslan, 2015) ile uyumludur. Araştırmada, piliçlerde korku düzeyini gösteren, TI sürelerinin (83,57-121,07 s), Abdourhamane (2019)'un belirttiği sürelerle (78-121 s) benzer olduğu görülmektedir.

Gross ve Siegel (1993), H/L oranını düşük, orta ve yüksek stres düzeylerinde sırasıyla 0,2, 0,5 ve 0,8 olarak belirtmişlerdir. Araştırma sonunda, ışık şiddeti ve tünek kullanımı gruplarında H/L oranının 0,25 ila 0,39 arasında değişmesinin piliçlerde düşük düzeyde stres olduğu görülmüştür. H/L oranını 20 lüks ışık şiddetinde yetiştirilen piliçlerde (0,25), 5 ve 80 lüks şiddet altındakilere göre daha düşük ( $P<0,01$ ) olduğu belirlenmiş olup, bu sonuç ışık şiddetinin H/L oranı üzerine etkisinin önemli olduğu yönündeki literatür bildiriş (Dereli Fidan ve ark., 2017a) ile paralellik göstermektedir. Tünek gruplarının değerlendirilmesinde istatistiksel önemde olmasa da tünek kullanılan grubun H/L oranının (0,31) daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada, tünek kullanımının etlik piliçlerde H/L oranı üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemsiz bulunması sonucuna benzer olarak, Heckert ve ark. (2002), Karaarslan (2015), Dereli Fidan ve ark. (2020b), H/L oranı bakımından tüneksiz; kontrol ve tünek grupları arasındaki farklılığın istatistiksel bakımdan önemsiz olduğunu bildirmişlerdir.

Stres durumunda kas glikojen depolarının kesim öncesinde tükenmesinden dolayı laktik asit birikimi azalırken, pH'nın yüksek düzeyde kaldığı ve bu durumun koyu et rengi oluşumuna, etin raf ömrünün kısalmasına ve kuru, sert bir yapıda olmasına neden olduğu bildirilmiştir (Güler, 2011).

Işık şiddeti gruplarında  $pH_{15}$  değeri bakımından 5 lüks grubunda (6,04), 80 lüks grubuna (5,92) göre daha yüksek ortalama olduğu gözlenmiştir ( $P<0,05$ ). Bu bulgu, Dereli Fidan ve ark. (2017b) loş ışık altında yetiştirilen etlik piliçlerin  $pH_{15}$  değerinin (6,74), parlak ışık altındakilere (6,68) göre daha yüksek ( $P<0,05$ ) olduğunu belirten literatür bildiriş ile uyum içerisindedir. Araştırmada  $pH_{15}$  değerinin 5 lüks grubunda daha yüksek çıkması, düşük ışık şiddeti altında yetiştirilen piliçlerde loş ışığın stres yaratmış olabileceğini düşündürmektedir.

Kas pH'sı aynı zamanda etin pişirme kaybı, su tutma kapasitesi, yumuşaklık ve raf ömrü gibi et kalite özellikleri ile yakından ilişkilidir (Bennato ve ark., 2021). Et yapısındaki proteinlerin 70-75°C ısıya maruz bırakıldıklarında denatüre oldukları ve bunun sonucunda da bir miktar suyun açığa çıktığı belirtilmiştir (Honikel, 1998). Araştırmada, göğüs eti pişirme kaybı 20 lüks ışık şiddeti grubunda (%20,44) 5 ile 80 lüks grubu piliçlerine (sırasıyla %22,35 ve %23,72) göre daha düşük düzeyde ( $P<0,001$ ) bulunmuştur. Benzer olarak, Güler (2011) çalışmasında stres altındaki piliçlerde pişirme kaybı oranını (%15,24) kontrol grubuna göre (%13,78) daha yüksek ( $P<0,001$ ) bulmuştur. Aynı şekilde, McKee ve Sams (1997) hindi göğüs etlerinde stres etkisi nedeniyle pişirme kaybının arttığını belirtmişlerdir. Bu sonuç, 5 ve 80 lüks ışık şiddeti gruplarındaki piliçlerin stres düzeylerinin daha yüksek olmasına bağlı olarak, protein denetürasyonu sonucunda hücrelerin su tutma yeteneklerindeki azalma ile daha sulu et oluşumunun, pişirme kaybını olumsuz etkilemesi ile açıklanabilir.

Araştırmada göğüs eti  $L^*$  değeri 57,48-58,78 arasında bulunmuş olup, bu değerlerin Zhuang ve Savage (2009) tarafından belirtilen orta renkli  $L^*$  değeri (55-59) tanımlamasında yer aldığı görülmektedir. Işık şiddetinin göğüs eti renk özellikleri bakımından  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  renk indeksleri üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Araştırma sonucu ile uyumlu olarak, stres altındaki etlik piliçlerde et rengi ölçütlerinden  $L^*$  ve  $a^*$  değerlerinin değişmediğini belirtmişlerdir (Güler, 2011). Dereli Fidan ve ark. (2017b) etlik piliçlerde ışık şiddetinin göğüs eti  $a^*$  ve  $b^*$  renk değerleri ile pişirme kaybını istatistiksel düzeyde etkilemediğini ifade etmişlerdir. Bu bulguların aksine, Dereli Fidan ve ark. (2017b) göğüs eti  $L^*$  değerini 20 lüks (parlak ışık) grubunda (52,61), loş ışık grubuna göre (54,30) daha düşük ( $P<0,05$ ) olduğunu bildirmişlerdir.

En yüksek su tutma kapasitesi %12,50 değeri ile 80 lüks grubunda, en düşük su tutma kapasitesi ise %10,86 değeri ile 5 lüks grubunda bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Gao ve ark. (2008) ve Güler (2011) araştırma sonucu ile uyumlu olarak, stres grubu

piliçlerinde göğüs eti pH<sub>24</sub> değerinin kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulunmasının etin su tutma kapasitesinin gerilemesine neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu durum, göğüs eti su tutma kapasitesi belirlenen piliçlerde, hayvanların 5 lüks ışık şiddeti (loş ışık) altında yetiştirilmesinin stres yaratmış olabileceğini düşündürmektedir. Cornforth (1994) yüksek su tutma kapasitesine sahip etlerin son pH değerinin de yüksek olduğunu ve bu etlerin koyu renkli olduğunu belirtmiştir. Araştırma sonuçlarının aksine Debut ve ark., (2003), göğüs eti su kaybının sıcaklık ya da taşımadan kaynaklanan stresten etkilenmediğini bildirmişlerdir. Araştırmalardaki bu farklılıklara, çalışmalarda değişik faktörlerin etkilerinin araştırılması, kullanılan metot farklılıkları, çalışmaların farklı ortam koşullarında gerçekleştirilmesi, incelenen materyalin sayısal büyüklüklerinin etkili olabileceği beklenen bir durumdur.

Tünek grubunda, su tutma kapasitesi hariç, incelenen tüm et kalite özellikleri açısından gruplar arası farklılıklar küçük ve istatistiksel açıdan da önemsiz bulunmuştur. Dereli Fidan ve ark. (2020a), tüneğin göğüs eti kalite özellikleri üzerine etkisinin çalışma sonuçlarına benzer şekilde istatistiksel bakımdan önemli çıkmadığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde, etlik piliçlerde tüneğin göğüs eti pasif su kaybı ve pişirme kaybı üzerine tünek etkisinin önemsiz olduğu bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2012). Araştırmada göğüs eti su tutma kapasitesi tünek grubunda (%12,45) tünek uygulanmayan gruba göre (%10,60) daha yüksek değerde bulunmuştur. Bu durum, piliçlerin tünek kullanılmayan bölmelerde yetiştirilmesinin göğüs eti su tutma kapasitesi üzerine olumsuz etki yaratmış olabileceğini düşündürmektedir. Su tutma kapasitesi bakımından tespit edilen bu değerler, Anadon (2002)'nin yaptığı araştırma bulguları (%9-24) ile uyumlu bulunmuştur.

Özetle, korku göstergesi olarak T1 süresi üzerine ışık şiddeti ve tünek faktörlerinin etkileri istatistiksel bakımdan önemsiz bulunmuştur. Işık şiddeti (5, 20, 80 lüks) uygulamaları ile tünek varlığı ya da yokluğunun piliçler üzerinde bir korku yaratmadığı görülmektedir. Araştırmada, 5 ve 80 lüks ışık şiddeti grubundaki etlik piliçlerde loş ve parlak ışığın kullanılması ile birlikte piliçlerde stresin şekillendiği ve strese cevap olarak H/L oranının yükseldiği gözlemlenmiştir. Stres düzeyini düşürmesi ve buna bağlı olarak refahı olumlu yönde etkilemesi bakımından etlik piliçlerde 20 lüks ışık şiddeti kullanımı faydalı olmaktadır. Et kalite özelliklerinden pH<sub>15</sub>'in 5 lüks ışık şiddeti grubunda 80 lüks şiddet grubuna göre daha yüksek değerde gözlenmiştir. Piliçlerin 5 lüks ışık şiddeti (loş ışık) ve tünek kullanılmadan yetiştirilmelerinin su tutma kapasitesini olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır. Tünek uygulamasının H/L oranı üzerine etkisi

istatistiksel olarak önemsiz bulunması, piliçlerde tünek kullanımının stres oluşumuna yada oluşabilecek olası stres düzeyini azaltma noktasında olumlu/olumsuz yönde önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Araştırmada, etlik piliçlerde tünek kullanımının, su tutma kapasitesi hariç, et kalite özellikleri üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

Bahsedilen konular üzerine yapılan bazı çalışmalar olmasına rağmen, incelenen faktörler bakımından farklı uygulamaların sonuçlarının kaydedilmesi anlamında araştırmaların devam ettirilmesinin yerinde bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir.

### Teşekkür

Bu çalışmanın T1 süresi ile ilgili verileri Aydın Adnan Menderes Üniversitesi BAP (VTF-19035) tarafından desteklenen yüksek lisans tezinden alınmıştır.

### Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

### Etik izin

Bu çalışma için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu (ADÜ-HADYEK) tarafından 64583101/2019/075 numara ile izin alınmıştır. Ayrıca yazarlar Araştırma ve Yayın Etiğine uyulduğunu beyan etmişlerdir.

### Benzerlik Oranı

Makalenin benzerlik oranının sisteme yüklenen raporda belirtildiği gibi % 11 olduğunu beyan ederiz.

### Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: EDF  
Tasarım: EDF  
Denetleme/Danışmanlık: EDF  
Veri Toplama ve/veya İşleme: EDF, EZO  
Analiz ve/veya Yorum: EDF, EZO  
Kaynak Taraması: EDF, EZO  
Makalenin Yazımı: EDF  
Eleştirel İnceleme: EDF

### Kaynaklar

Abdourhamane İM, 2019: Serbest dolaşım (free range) barındırma sistemi ve yavaş gelişen etlik piliç genotiplerinin büyüme performansı, hayvan refahı ve davranışları ile ayak sağlığı ve ekonomik verimlilik

- üzerine etkileri. Doktora Tezi, UÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Alvino GM, Archer GS, Mench JA, 2009: Behavioural time budgets of broiler chickens reared in varying light intensities. *Appl Anim Behav Sci*, 118 (1-2), 54-61.
- Anadon HLS, 2002: Biological, nutritional, and processing factors affecting breast meat quality of broilers. PhD Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- Anderson MG, Campbell AM, Crump A, Arnott G, Newberry RC, Jacobs L, 2021: Effect of environmental complexity and stocking density on fear and anxiety in broiler chickens affiliations. *Animals*, 11 (8), 2383.
- Bennato F, Ianni A, Martino C, Grotta L, Martino G, 2021: Evaluation of chemical composition and meat quality of breast muscle in broilers reared under light-emitting diode. *Animals*, 11 (6), 1505.
- Campo JL, Gil MG, Davila SG, Munoz I, 2005: Influence of perches and footpad dermatitis on tonic immobility and heterophil to lymphocyte ratio of chickens. *Poult Sci*, 84 (7), 1004-1009.
- Cornforth DP, 1994: Color and Its Importance. Pearson AM and Dutson TR (Ed), 34-78. In: Quality Attributes and Their Measurement in Meat, Poultry, and Fish Products. Chapman and Hall, London, UK.
- Debut M, Berri C, Baeza E, Sellier N, Arnould C, Guemene D, Jehl N, Boutten B, Jago Y, Beaumont C, Le Bihan-Duval E, 2003: Variation of chicken technological meat quality in relation to genotype and preslaughter stress conditions. *Poult Sci*, 82 (12), 1829-1838.
- Dereli Fidan E, Türkyılmaz MK, Nazlıgül A, Kaya M, 2020a: The effects of perch cooling on performance, carcass, and meat quality characteristics and behaviour of broilers reared at high temperatures with different litter thicknesses. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 67 (4), 373-379.
- Dereli Fidan E, Kaya M, Nazlıgül A, Türkyılmaz MK, 2020b: The effects of perch cooling on behavior, welfare criteria, performance, and litter quality of broilers reared at high temperatures with different litter thicknesses. *Braz J Poultry Sci*, 22 (3), 1-12.
- Dereli Fidan E, Nazlıgül A, Türkyılmaz MK, Karaarslan S, Kaya M, 2017a: Effects of photoperiod length and light intensity on performance, carcass characteristics and heterophil to lymphocyte ratio in broilers. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 23 (1), 39-45.
- Dereli Fidan E., Nazlıgül A., Türkyılmaz M. K., Aypak S. Ü., Kilimci, F. S., Karaarslan, S., Kaya, M, 2017b. Effect of photoperiod length and light intensity on some welfare criteria, carcass, and meat quality characteristics in broilers. *R Bras de Zootec*, 46 (3), 202-210.
- EU, 2007: Council of the European Communities, 2007/43/EC, Council Directive. Laying Down Minimum Rules for the Protection of Chickens Kept for Meat Production, Off. J.L., 182, 19-28.
- Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A, 2007: G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*, 39 (2), 175-191.
- Gao J, Lin H, Song ZG, Jiao HC, 2008: Corticosterone alters meat quality by changing pre-and postslaughter muscle metabolism. *Poult Sci*, 87 (8), 1609-1617.
- Gross WB, Siegel HS, 1993: General principles of stress and welfare. In: Livestock, Handling and Transport, p. 21- 34. CAB International, Wallingford, UK.
- Güler HC, 2011: Etlik piliçlerde fizyolojik stresin kan parametreleri ile et kalitesi üzerine etkileri ve ilgili özelliklerin kalıtımı. EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir.
- Heckert RA, Estevez I, Russek-Cohen E, Pettit-Riley R, 2002: Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. *Poult Sci*, 81 (4), 451-457.
- Honikel KO, 1998: Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Sci*, 49 (4), 447-457.
- Jones RB, Faure JM. 1980: Tonic immobility (righting time) in the domestic fowl: Effects of various methods of induction. *IRSC Med Sci*, 8, 184-185.
- Karaarslan S, 2015: Etlik piliçlerde refah kriteri olarak bacak sağlığı, korku ve stres parametreleri üzerine aydınlatma, yerleşim sıklığı ve tünek kullanımının etkileri. Doktora Tezi, ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- McKee SR, Sams AR, 1997: The effect of seasonal heat stress on rigor development and the incidence of pale, exudative turkey meat. *Poult Sci*, 76 (11), 1616-1620.
- Olanrewaju HA, Miller WW, Maslin WR, Collier SD, Purswell JL, Branton SL, 2015: Influence of photoperiod, light intensity and their interaction on health indices of modern broilers grown to heavy weights. *Int J Poult Sci*, 14 (4), 183-190.
- Snedecor GW, Cochran WG, 1989: Statistical Methods. 8th Edition, Iowa State University Press, Ames.
- Ventura BA, 2009: Effects of barrier perches and stocking density on the behavior, space use, and leg health of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). PhD Thesis, University of Maryland, Maryland.
- Zhao JP, Jiao HC, Jiang YB, Song ZG, Wang XJ, Lin H, 2012: Cool perch availability improves the performance and welfare status of broiler chickens in hot weather. *Poult Sci*, 91 (8), 1775-1784.
- Zhuang H, Savage EM, 2009: Variation and Pearson correlation coefficients of Warner-Bratzler shear force measurements within broiler breast fillets. *Poult Sci*, 88 (1), 214-220.

\*Yazışma Adresi: Evrim DERELİ FİDAN

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye.

e-mail: edereli@adu.edu.tr

## Kedi ve Köpeklerde Metakarpal ve Metatarsal Kırıkların Tedavisi (32 Vakada Retrospektif Değerlendirme)

Mehmet Zeki Yılmaz DEVECİ<sup>1,a,\*</sup>, Muhammed Enes ALTUĞ<sup>1,b</sup>, İbrahim ALAKUŞ<sup>1,c</sup>, Ziya YURTAL<sup>1,d</sup>,  
Ömer KIRGIZ<sup>1,e</sup>, Halil ALAKUŞ<sup>1,f</sup>, Eren CEYLAN<sup>1,g</sup>, Cafer Tayer İŞLER<sup>1,h</sup>

<sup>1</sup>Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-9532-247X, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0003-3896-9944, <sup>c</sup>ORCID: 0000-0002-2031-7035, <sup>d</sup>ORCID: 0000-0001-6080-1860, <sup>e</sup>ORCID: 0000-0002-0222-1363, <sup>f</sup>ORCID: 0000-0001-9265-2310, <sup>g</sup>ORCID: 0000-0001-6095-7937, <sup>h</sup>ORCID: 0000-0002-1910-8316

Geliş Tarihi: 18.01.2022

Kabul Tarihi: 05.04.2022

**Özet:** Küçük hayvan hekimliğinde kedi ve köpeklerde metakarpal (MK) ve metatarsal (MT) kırıklarla sık karşılaşılmaktadır. Tedavide konservatif ve cerrahi yöntemler tanımlanmıştır. Bu çalışmada MK/MT kırık belirlenen 32 vakanın (22 kedi, 10 köpek) tanı, tedavi ve prognoz süreçlerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Hastaların demografik ve diyagnostik bilgileri, yapılan preoperatif ve perioperatif işlemler, uygulanan tedaviler, postoperatif işlemler ve prognoz süreci çalışma kapsamındadır. MK/MT toplam 97 kırık kemikte en çok diyafizer 1/3 (43 kemik) ve distal 1/3 (48 kemik) lokalizasyonlarda kırıklar belirlendi. En çok görülen kırık şekilleri transversal (65) ve oblik (27) olarak belirlendi. Toplam 39 ekstremitenin %25.64'ünde bir kemik, %20.51'inde iki kemik, %33.33'ünde üç kemik, %20.51'inde dört kemiğin kırıldığı belirlendi. Tedavide MK/MT kırığı olan 39 ekstremiteden 11 ekstremitede eksternal koaptasyon, 23 ekstremitede açık cerrahi redüksiyon ile osteosentez, 4 ekstremitede kafes istirahati ve 1 ekstremitede amputasyon uygulandı. Kedi ve köpeklerin toplamında cerrahi osteosentez uygulanan 23 ekstremiteden 19'unda prognoz çok iyi, 3'ünde iyi olduğu ve bir vakada postoperatif ölüm şekillendiği belirlendi. Eksternal koaptasyon uygulanan 11 ekstremitenin 6'sında çok iyi, 5'inde iyi; kafes istirahati uygulanan 4 ekstremiteden 2'sinde çok iyi, birinde iyi ve birinde orta olarak belirlendi. Bu çalışmayla kedi ve köpeklerin metakarpal ve metatarsal kırıklarının tedavi süreci, tanı ve klinik sonuçlar ile birlikte değerlendirilerek özgün veriler sunuldu. Kapalı, disloke olmamış, MK ve MT kemiklerin yük binmeyen veya tek kemiğinde olan kırıklarda konservatif tedavinin başarılı olabildiği; ancak, iki veya daha fazla kemiğin etkilendiği, disloke olmuş ve yük verilen MK/MT kırıklarda cerrahi osteosentez uygulamasının elzem olduğu kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Ekstremitte, İntramedüller pin, Ortopedi, Osteosentez, Veteriner.

### Treatment of Metacarpal and Metatarsal Fractures in Cats and Dogs (Retrospective Evaluation of 32 Cases)

**Abstract:** Metacarpal (MC) and metatarsal (MT) fractures are common in small animal medicine in cats and dogs. Conservative and surgical methods have been described for treatment. This study was aimed to evaluate the diagnosis, treatment, and prognosis of 32 cases (22 cats, 10 dogs) with MC/MT fractures. The demographic and diagnostic information of the patients, procedures (before, during and after the operation), treatments applied, and prognosis findings are within the scope of the study. Ninety-seven bones with MC/MT fractures were most at diaphyseal 1/3 (43 bones) and distal 1/3 (48 bones) localizations. The most common fracture types were transverse (65) and oblique (27). The fractures of 39 extremities were single bone fractures in 25.64%, two bones in 20.51%, three bones in 33.33%, and four bones in 20.51%. Treatment methods were external coaptation in 11 extremities, surgical osteosynthesis in 23 extremities, cage rest in four extremities, and amputation in one extremity. It was determined that the prognosis was excellent in 19 of 23 extremities that underwent surgical osteosynthesis, good in three, and postoperative death occurred in one case. Out of 11 extremities with external coaptation, six were excellent, and five were good. It was determined that two of the four extremities treated with cage rest were very good, one was good, and one was moderate. This study has evaluated the treatment of metacarpal and metatarsal fractures in cats and dogs in terms of diagnostic and clinical results, and original data were presented. Conservative treatment is considered successful in fractures if closed, not dislocated, without weight-bearing bones on the metacarpal and metatarsal bones or if only one MC/MT bone is fractured. However, it was shown that surgical osteosynthesis is essential if the fractures are dislocated, and the two or more weight-bearing bones are affected.

**Keywords:** Extremity, Intramedullary pin, Orthopedics, Osteosynthesis, Veterinary.

### Giriş

Kedi ve köpeklerde metakarpal (MK) ve metatarsal (MT) kırıklarla sık karşılaşılmaktadır. Tüm kırıklar arasındaki oranı köpeklerde %8.1, kedilerde ise

%3.3 olarak bildirilmiştir (Okumura ve ark., 2000). Önemli görevsel semptomlara neden olması ya da tedavi edilmemesi durumunda komplikasyonlara yol

açması nedeniyle mutlaka tedavi edilmesi gereken kırıklar arasındadır. En yaygın nedenler motorlu taşıt kazaları ve yüksekten düşme olmakla birlikte ateşli silah yaralanmaları, ısırıklar, biçme makinesi, tuzak yaralanmaları ve üzerine basılma gibi nedenlerle de oluşabilmektedir (Altuğ ve ark., 2017; Degasperi ve ark., 2007; Kornmayer ve ark., 2014). Köpeklerdeki MK ve MT kırıklar genellikle birden fazla kemikte şekillenir. Bu kırıkların çoğu kapalı, transversal veya oblik kırıklardır (Kornmayer ve ark., 2014).

Kedi ve köpeklerde MK ve MT kemik kırıkları konservatif veya cerrahi yöntemlerle tedavi edilebilmektedir (Gomaa ve ark., 2016). Kırık uçlarının birbirinden uzaklaşmadığı veya minimal yer değiştirdiği kırıklarda konservatif tedavi uygulanmaktadır (Deveci ve ark., 2020; Fitzpatrick ve ark., 2011; Gomaa ve ark., 2016). Cerrahi tedavide açık redüksiyon ile internal fiksasyon teknikleri sık kullanılmaktadır ancak zaman zaman eksternal fiksasyon uygulamaları da tercih edilebilmektedir (Fitzpatrick ve ark., 2011). Cerrahi veya konservatif tedavi yöntemlerinin planlanmasında hastanın ve kırığın özellikleri, cerrahın tecrübesi ve tercihi, hasta sahibinin yaklaşımı gibi bileşenler belirleyici olmaktadır.

## Materyal ve Metot

Çalışmada, 2015-2020 yılları arasında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Cerrahi Kliniği'nde metakarpal ve metatarsal kırık teşhis ve tedavi edilen 32 vakanın demografik, diyagnostik, tedavi ve prognoz bilgileri retrospektif olarak incelendi. Çalışma, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (2021/02-05) kararı ile onaylanmıştır.

Hastaların eşkal ve detaylı anamnez bilgileri incelendi. Klinik bulgular, radyografik görüntüler, tam kan sayımı sonuçları, tedavi ve prognoz süreci değerlendirildi. Radyografik incelemede kırığın yeri, kırığın şekli, kırık kemikler ve sayıları belirlendi. Tam kan sayımı sonuçları incelendi. Cerrahi yöntemle tedavi uygulanacak hastalarda, tam kan sayımı sonuçları normal sınırlarda olan hastalara 2 gün, anormal olanlar ise 6 gün içinde uygun tedavi işlemlerinden sonra ameliyat yapıldı. Perioperatif sefazolin sodyum (25 mg/kg, IM, Sefazol, Mustafa Nevzat, İstanbul, Türkiye) ve metamizol sodyum (15 mg/kg, IV, Andolor, İbrahim Ethem Ulagay İlaç San., İstanbul, Türkiye) uygulandı. Genel anestezi induksiyonu ksilazin HCl (2 mg/kg Alfazyne %2, Egevet, Türkiye) ve ketamin HCl (10 mg/kg, Alfamine %10, Egevet, Türkiye) ile, idame ise %2-3 izofluran (Isoflurane-USP, Adeka İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., Samsun, Türkiye) inhalasyon anestezisi

ile sağlandı. Hastaların ameliyat bölgesi asepsi ve antisepsi kurallarına uygun olarak hazırlandı. Hastalarda uygulanacak tedavi yöntemi MK/MT kırık kemik sayısı, yeri ve kemik uçlarının deplase olup olmamasına göre belirlendi. Konservatif tedavi amacıyla vakalarda üç hafta süreyle eksternal koaptasyon veya hareket kısıtlaması uygulandı. Cerrahi yöntemle tedavi edilen vakalarda retrograd intramedüller pin yöntemiyle osteosentez uygulandı. Bu amaçla metakarpal/metatarsal bölgeye dorsalden cerrahi yaklaşım uygulandı. Cerrahi osteosentez işlem aşamaları Şekil 1'de sunuldu. Postoperatif antibiyotik olarak sefazolin sodyum (25 mg/kg, 12 saat ara ile, IM) 7 gün, analjezik olarak kedilerde tolfenamik asit (3 mg/kg, 24 saat ara ile, PO, Tolfedine tablet, Novakim İlaç ve Kimya San.Tic. A.Ş., Kocaeli, Türkiye), köpeklerde karprofen (4 mg/kg, 24 saat ara ile, PO, Rimadyl tablet, Zoetis Hayvan Sağlığı Ltd. Şti., Ümraniye/İstanbul) 5 gün uygulandı. Postoperatif muayeneler kırık iyileşmesinde prokallus ve kallus oluşma süreleri olan 7 ve 21. günlerde yapıldı. Devam eden süreçte hastaların eş zamanlı patolojileri ve kırık iyileşme durumuna göre ek takiplere 2-4 ay devam edildi.

## Bulgular

MK/MT kırığı teşhis edilen kediler yaş dağılımında 8 kedi <1 yaş, 13 kedi 1-7 yaş arası, 1 kedi 7 yaşından büyüktü (aralık 0.3-7, ortalama 1.59±1.54, ortanca 1). Köpek vakaları yaş dağılımında 6 köpek <1 yaş ve 4 köpek 1-7 yaş arasında (aralık 0.15 – 5, ortalama 1.38 ± 1.92, ortanca 0.4) belirlendi. Vakaların cinsiyet dağılımı kedilerde 7 erkek (%31.81) ve 15 dişi (%68.19) iken köpeklerde 9 (%90) erkek ve 1 dişi (%10) şeklindedir. Etiyolojide en sık olarak kedilerde yüksekten düşme (%73) ve köpeklerde trafik kazası (%50) ile karşılaşıldı (Şekil 2). Klinik muayene sonuçlarında tüm vakalarda topallık, lokal ağrı ve hassasiyet belirlendi. Yumuşak doku bütünlüğü bozulan 1 kedi ve 1 köpekte açık kırık ve enfekte dokular belirlendi.

**Tablo 1.** Metakarpal ve metatarsal kırık yerleşimleri.

Kırık Yerleşimi	Kedi		Köpek		Toplam	
	MK	MT	MK	MT	MK	MT
Proksimal 1/3	5	0	1	0	6	0
Orta 1/3	19	16	8	0	27	16
Distal 1/3	28	7	4	9	32	16
<b>Toplam</b>	<b>52</b>	<b>23</b>	<b>13</b>	<b>9</b>	<b>65</b>	<b>32</b>



Kırık lokalizasyonlarında MK/MT toplam 97 kırık kemikte en çok diyafizer 1/3 (43 kemik) ve distal 1/3 (48 kemik) kırıkları ile karşılaşıldığı belirlendi (Tablo 1). En çok görülen kırık şekilleri sırasıyla transversal (65) ve oblik (27) kırıklar olarak belirlendi (Tablo 2).

**Tablo 2.** Metakarpal ve metatarsal kırık şekilleri.

Kırık Şekilleri	Kedi		Köpek		Toplam	
	MK	MT	MK	MT	MK	MT
Transvers	34	19	10	2	44	21
Oblik	16	3	1	7	17	10
Parçalı	2	1	2	0	4	1
Toplam	52	23	13	9	65	32

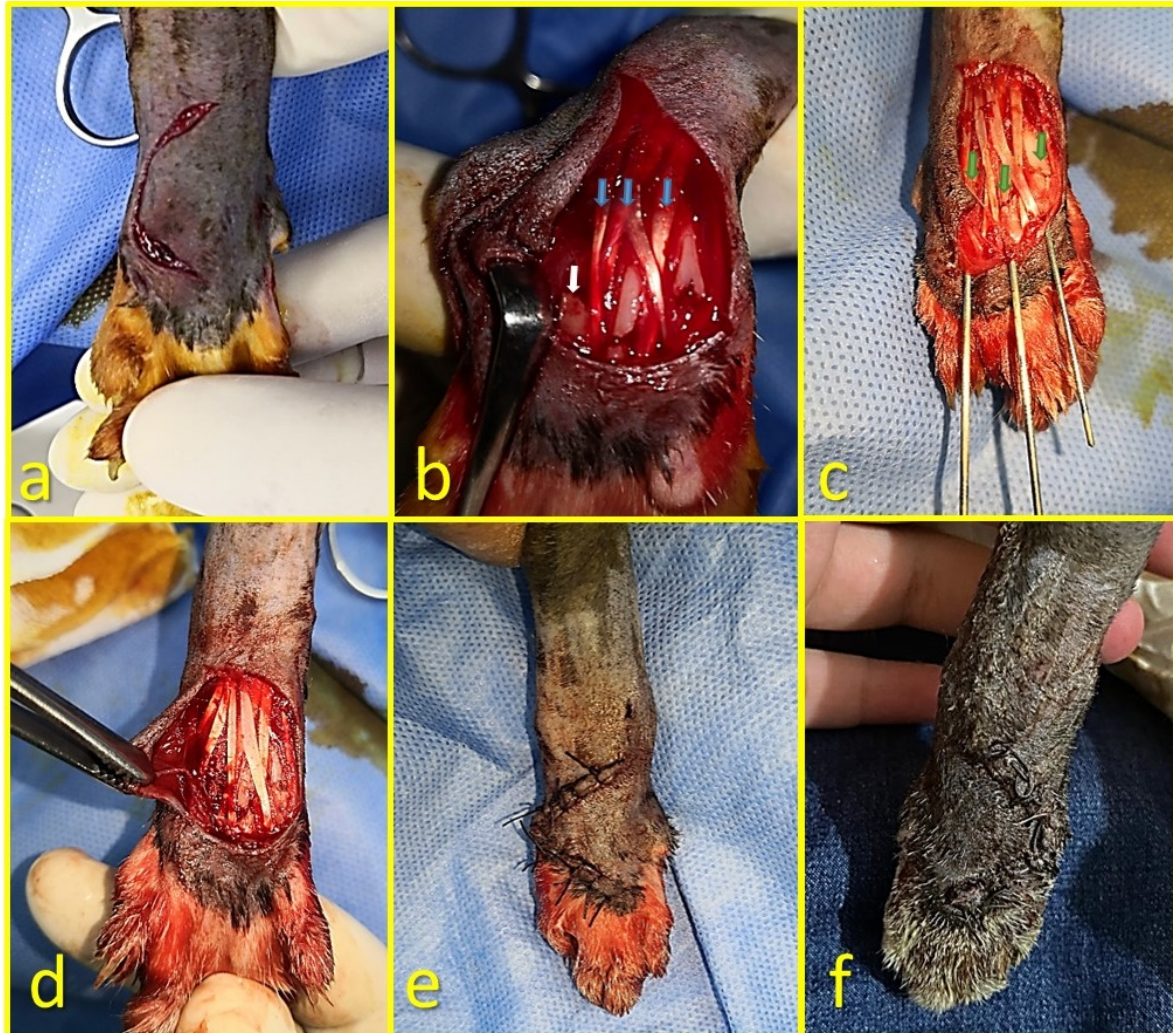
İncelenen 97 kırık kemiğin 86 tanesinde (%88.66) kırık uçları anatomik pozisyonunu kaybetmiş, 11

tanesinde (%11.34) anatomik pozisyonundan ayrılmamıştır.

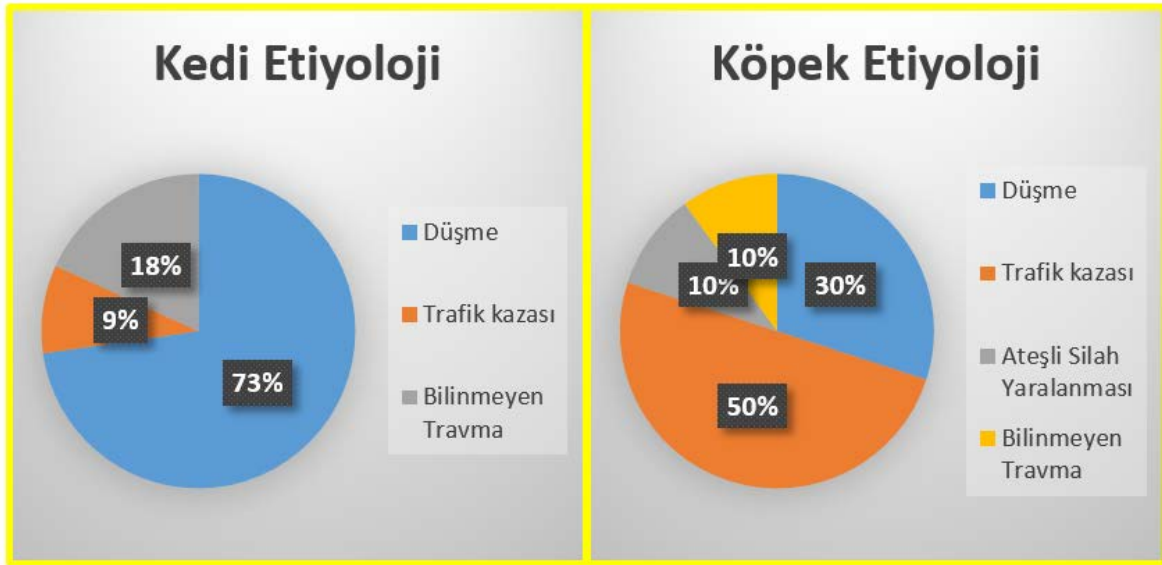
**Tablo 3.** Aynı ekstremitede bir iki, üç, dört kemik kırılma oranları.

	Kedi	Köpek
Tek kemik kırık oranı	%20.69	%40
İki kemik kırık oranı	%24.14	%10
Üç kemik kırık oranı	%31.03	%40
Dört kemik kırık oranı	%24.14	%10

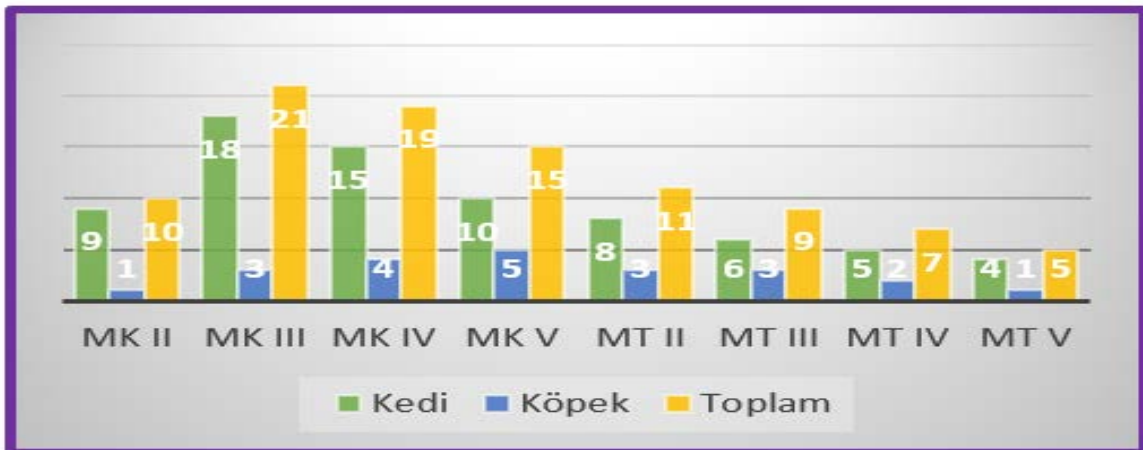
Kedi ve köpeklerde aynı ekstremitede-deki kırık sayılarının özeti Tablo 3'te gösterilmiştir. Vakalarda MK kemiklerde en çok MK III ve MT kemiklerde en çok MT II'nin kırıldığı tespit edilmiştir. Metakarpal (MK II-III-IV-V) ve metatarsal kemiklerin (MT II-III-IV-V) kırık sayıları Şekil 3'te gösterilmiştir.



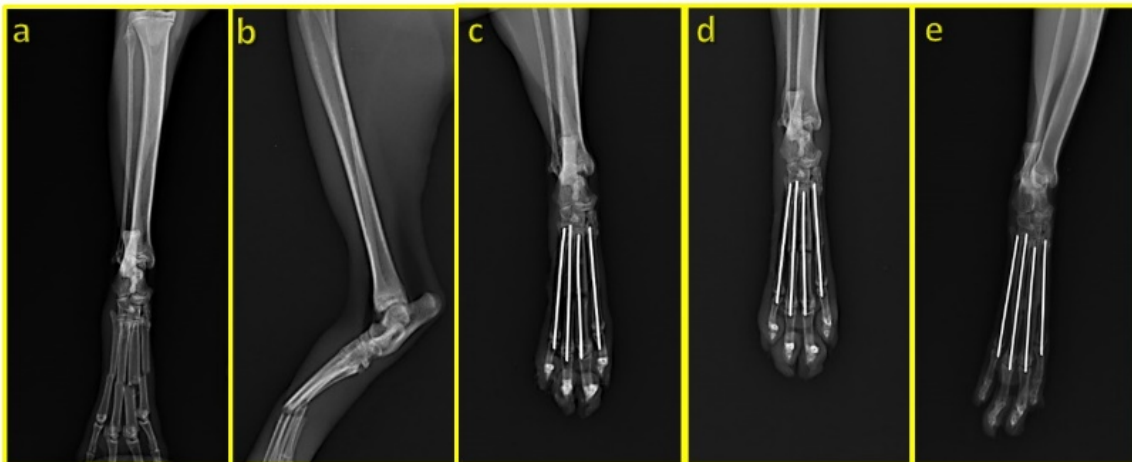
**Şekil 1.** a) Deri ensizyonu b) Ekstensor tendoların diseksiyonu ve kırık uçlarının açığa çıkarılması (mavi oklar ekstensor tendolar, beyaz ok kırık kemik fragmentinin ucu) c) Kemik redüksiyonunun retrograd Kirschner teli uygulaması ile yapılması d) Kirschner telinin dipten kesilip çakıldıktan sonraki görünümü e) Dikişler sonrası postoperatif görünüm f) Postoperatif 1. hafta muayenesinde ameliyat bölgesinin görünümü.



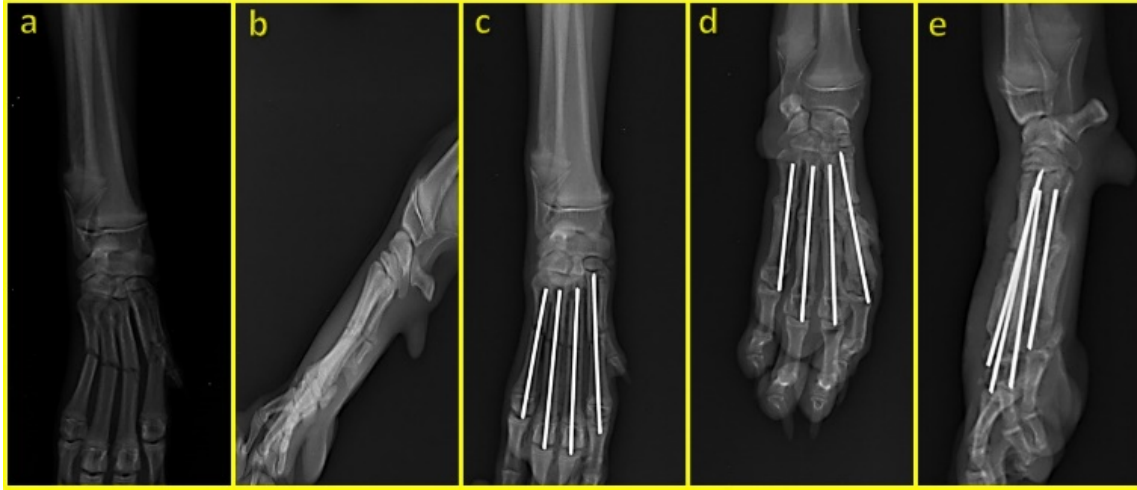
Şekil 2. Kedi ve köpeklerde metatarsal ve metakarpal kırıkların etiyoloji oranları.



Şekil 3. Metakarpal ve metatarsal kırık sayıları.



Şekil 4. Bir kedide MT kırığının preoperatif (a, b) ve postoperatif (c: ilk gün, d: 3. hafta sonra, e: 4 ay sonra) radyografileri.



**Şekil 5.** Bir köpekte MK kırığının preoperatif (a, b) ve postoperatif (c: ilk gün, d, e: 3 hafta sonra) radyografileri.

Tedavi takip muayenelerinde klinik bulgularla birlikte radyografik görüntüler incelenerek vakalarda kırık iyileşmesi değerlendirildi (Şekil 4 ve 5). Değerlendirmede radyografik incelemede kırık iyileşmesi, klinik bulgularda yürüyüş, duruş, topallık, hasta sahibinin memnuniyeti gibi kriterler dikkate alınarak tedavi sonucu cerrah tarafından belirlendi (Kapatkin ve ark., 2000; De La Puerta ve ark., 2008; Degaspero ve ark., 2007). Bu kriterlere ait bulguların tamamında sorunsuz iyileşme olması "çok iyi", hafif bulgular olması "iyi" olarak değerlendirildi.

Tedavi yöntemi olarak kedilerde 9 ekstremitede eksternal koaptasyon, 17 ekstremitede açık cerrahi redüksiyon ile osteosentez, 2 ekstremitede kafes istirahati ve 1 ekstremitede amputasyon uygulandı. Köpeklerde 2 ekstremitede eksternal koaptasyon, 6 ekstremitede açık cerrahi redüksiyon ile osteosentez ve 2 ekstremitede kafes istirahati uygulandı.

Postoperatif süreçte kedilerde 29 ekstremitenin klinik ve radyografik muayene değerlendirmelerinde 6 ekstremitede iyi, 21 ekstremitede çok iyi olarak belirlendi. Bir ekstremitede amputasyon uygulanması nedeniyle, bir ekstremitede ise hastanın anesteziden uyanma döneminde ölümü nedeniyle postoperatif süreçte değerlendirilemedi. Köpeklerde tedavi uygulanan 10 ekstremitenin postoperatif süreçteki değerlendirmesinde 2 ekstremitede iyi, 7 ekstremitede çok iyi olarak belirlendi. Amputasyon uygulanan bir ekstremitede değerlendirme yapılmadı.

### Tartışma ve Sonuç

Retrospektif çalışmalar, hastalıkların teşhis ve uygulanacak tedavi seçeneklerini değerlendirme ve yeni çalışmaların planlanmasında bilimsel dayanak oluşturma açısından hem veteriner hem beşerî tıp alanlarında önemli bir yere sahiptir (Altuğ ve ark.,

2017; İşler ve ark., 2015). Kedi ve köpeklerde birçok bölgedeki kırık tedavileriyle ilgili retrospektif çalışmalar yapılmakta, tedavi yöntemleri ve başarısına dair veteriner cerrahlara yol gösterecek veriler sunulmaktadır (Baroncelli ve ark., 2012; Libardoni ve ark., 2018; Minar ve ark., 2013; Pozzi ve ark., 2013). Kedi ve köpeklerde metakarpal ve metatarsal kırıklarda eksternal koaptasyon (Gomaa ve ark., 2016; Kapatkin ve ark., 2000) ile konservatif tedavinin tanımlandığı çalışmaların yanı sıra sirküler eksternal fiksator (Seibert ve ark., 2011), epoksi ile eksternal fiksator (De La Puerta ve ark., 2008), germe bandı (Wernham ve Roush, 2010), intramedullar pin (Degaspero ve ark., 2007), Dowel pin tekniği (Kornmayer ve Matis, 2017; Zahn ve ark., 2007), intramedullar pin ve eksternal fiksasyon kombinasyonu (Fitzpatrick ve ark., 2011), plak kullanımı (Gomaa ve ark., 2016) ve vida kullanımı (Kapatkin ve ark., 2000) gibi operatif yöntemlerinin tanımlandığı çalışmalar mevcuttur. Ancak MK ve MT kırıkları; kırılan kemik sayısı (bir veya daha fazla), kırılan kemiklerin farklı lokalizasyonlarda, sayılarda ve şekillerde olması, kırık uçların yer değiştirme dereceleri gibi önemli farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar tedavi için temel kuralların oluşturulmasını zorlaştırmaktadır. Bu yüzden bu konudaki retrospektif çalışmalar oldukça değerlidir (Kornmayer ve ark., 2014). Özellikle Türkiye’de bu başlıktaki çalışmalar son derece kısıtlıdır (Aker 1998; Candaş ve Sağlam 1990). Bu bağlamda çalışmamız ile kedi ve köpeklerde metakarpal ve metatarsal kırıkların tanı, tedavi yöntemleri ve sonuçları hakkında özgün veriler sağlandı. Çalışmamız sonuçlarına dayanarak, metakarpal ve metatarsal kırıkların tedavisine yönelik prospektif çalışmaların planlanmasında, farklı implantların ve yöntemlerin üstünlüklerinin araştırılması önerilebilir. Postoperatif süreçte bilgisayarlı tomografi gibi ileri görüntüleme yöntemleri ile vakaların incelendiği



çalışmalar, kırık hattı ve çevresindeki değişimlerin daha detaylı incelenmesine ve yöntemin başarısını değerlendirmeye katkı sağlayacaktır.

Fitzpatrick ve ark. (2011) kedilerdeki MK kırıkları en yaygın olarak distal 1/3 bölgede (16/25), MT kırıkları ise proksimal 1/3 bölgede (21/40) bildirmiştir. Çalışmamızda kedilerdeki 52 MK kırığın 28'i distal 1/3, 23 MT kırığın 16'sı diyafizer 1/3 yerleşimde olmasıyla özellikle MT kırıkları açısından farklıdır. Fitzpatrick ve ark. (2011), köpeklerde MK kırıklarının en sık diyafizer 1/3 (20/31), MT kırıklarda ise proksimal 1/3'te (8/12) şekillendiğini ortaya koymuştur. Çalışmamızda ise köpeklerdeki 13 MK kırığın 8'i diyafizer 1/3, 9 MT kırığın tamamı distal 1/3'tedir ve yine özellikle MT kırıklarda çalışmamızın sonucu oldukça farklıdır. Bir başka çalışmada da MK kırıklarının diyafizer veya distal bölgelerde, MT kırıklarının ise proksimal bölgede daha sık olduğu bildirilmiştir (Gomaa ve ark., 2016). De La Puerta ve ark. (2008) kedi ve köpeklerde MK kemik kırıklarının diyafizer ve distal, MT kemik kırıklarının ise proksimal ve diyafizer bölgeleri etkileme olasılığının daha yüksek olduğunu öne sürmüştür. Çalışmamız sonuçları kedi ve köpeklerin toplamı değerlendirildiğinde bu çalışmalarla MK kırıklarının lokalizasyonu bakımından uyumlu iken MT kırıklarının lokalizasyonu bakımından oldukça farklıdır. Bu farklılıklarda etiyolojik faktörler belirleyici olmaktadır. Çalışmalarda farklı sonuçlar olması nedeniyle etiyolojiyi değerlendirmek için daha fazla retrospektif çalışmaya ve sonrasında etiyolojiyi inceleyen meta analiz çalışmasına ihtiyaç vardır. Yapılacak retrospektif çalışmalarda kırık nedeni ve hastanın ırk, yaş, cinsiyet gibi bilgilerinin yanı sıra kısırlaştırma durumu, yaşam alanı, eş zamanlı hastalıklar gibi detaylar toplanacak veriler arasında olmalıdır. Kırık şekilleri yönünden değerlendirmede Fitzpatrick ve ark. (2011) bildirdiği kedi ve köpeklerdeki en sık karşılaşılan MK kırık şekilleri çalışmamızla büyük oranda benzerlik göstermektedir. Kırık tiplerindeki bu benzerliğin kedilerde etiyolojideki yüksekte düşme eğiliminden kaynaklandığı düşünülebilir. Ancak Fitzpatrick ve ark. (2011) çalışmasında en sık görülen MT kırık şekli transvers iken bizim çalışmamızda oblik olması farklılık olarak dikkat çekmektedir. Bu farklılığın da etiyolojinin çeşitliliği nedeniyle olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda aynı ekstremitede kırılan kemik sayıları farklı çalışmalarla karşılaştırıldığında tek kemik kırığı oranı Muir ve Norris'in (1997) yaptığı çalışmadan yaklaşık 0.7 kat, Kornmayer ve Matis'in (2017) çalışmasından yaklaşık 4.2 kat fazladır. İki kemik kırığı Muir ve Norris'in (1997) çalışmasından yaklaşık 0.4 kat, Kornmayer ve Matis'in (2017) çalışmasından 0.6 kat daha azdır. Üç kemik kırığı Muir ve Norris'in (1997) çalışmasından yaklaşık 1.2

kat, Kornmayer ve Matis'in (2017) çalışmasından 0.3 kat daha fazladır. Dört kemik kırığı ise Muir ve Norris'in (1997) çalışmasından yaklaşık 0.8 kat ve Kornmayer ve Matis'in (2017) çalışmasından 0.7 kat az sıklıkla şekillenmiştir. Kornmayer ve ark. (2014) köpeklerde üç ve dört kemiğin kırılma oranı toplamını %49 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki sonuç da (%50) bu oranlarla benzerdir. Metakarpal ve metatarsal kırıklarda etiyoloji genellikle kırık sayılarını belirleyen en önemli etken olduğundan çalışmalar arasında farklılıklar veya benzerlikler değişmektedir. Çalışmalardaki vakalar arasındaki farklılıklar nedeniyle veriler birbiri ile oransal olarak kıyaslanmaktadır. Kedilerde ve köpeklerde en çok MK ve MT II ve III kırıkları şekillenmesinde bu kemiklerin en çok yük taşıyan kemikler olmasının sebep olduğu düşünülmektedir. Köpeklerde farklı olarak MK/MT V kırıklarıyla da kedilerden daha sık karşılaşılma nedeni olarak köpeklerin koşması, zıplaması veya düşmesi gibi olaylar sırasında bu kemiğe de ani yükler gelmesi olduğu düşünüldü.

MK ve MT kırıklarının tedavisi vakaya göre değişmektedir. Kırılan kemikler, kırıkların disloke, parçalı veya açık kırık olup olmadığı, hastanın yaş, ağırlık gibi özellikleri ve diğer bireysel faktörleri, hasta sahibinin yaklaşımı, kırık şekillenme süresi tedavi planlamasında farklı tercihleri gerektirebilmektedir. MK ve MT kemiklerde basit ve disloke olmayan kapalı kırıklarda, tek kemik veya üzerine yük binmeyen iki kemiğin etkilendiği kırıklarda konservatif sağaltım yöntemlerinin başarılı olduğu bildirilmektedir (Fitzpatrick ve ark., 2011; Gomaa ve ark., 2016). Çalışmamızda bu nitelikleri taşıyan vakalarda eksternal koaptasyon ile konservatif tedavi uygulanmış ve prognoz süreci çok iyi seyretmiş, başarılı sonuçlar alınmıştır. Wernham ve Roush (2010), metakarpal/metatarsal III – IV kırıklarında cerrahi yöntemin endike olduğunu belirtmektedir. Çalışmamızda bu iki kemiğin birlikte kırıldığı 15 ekstremitede cerrahi yöntem uygulandı. Bunların 14'ünde prognoz çok iyi, birinde ise iyi olarak kaydedildi. Dowel pin tekniği uygulanan bir çalışmada postoperatif süreçte implant gevşemesi, redüksiyon kaybı ve osteomyelit gibi komplikasyonlar bildirilmiştir (Kornmayer ve Matis, 2017). Çalışmamızda ise cerrahi osteosentez tekniği olarak retrograd intramedullar (IM) pin yöntemi kullanıldı. Retrograd IM pin yönteminde eklem hasarı ve irritasyonu gibi toplallığa neden olan komplikasyonların sık olduğunu belirten çalışmalar (Fitzpatrick ve ark., 2011; Gomaa ve ark., 2016; Zahn ve ark., 2007) olsa da sonuçlarımızda eklem ilişkili komplikasyonlar olmaması bu çalışmalardan iyileşme süreci ve prognoz değerlendirmesini etkileyen önemli bir farklılıktır. Çalışmamızda pinlerin kesildikten sonra metakarpofalegeal/metatarsofalegeal eklem üzerinde kalan kısmının kemiğe gömülecek şekilde

çakılması işlemi eklem yüzeyinde çıkıntı yapan bir pin ucu kalmaması sayesinde irritasyonun engellenmesi, pinin proksimal fragmente tam sıkışmasının sağlanması ve böylece pin migrasyonu olasılığının azaltılması gibi avantajlar elde edilmektedir. Çalışmamızda pin ilişkili komplikasyon gelişmemesinin nedeninin bu olduğu düşünülmektedir. Bir çalışmada Dowel pin yöntemi; uygulanmasının kolay olması, pinin yerleştirilmesi sırasında iatrojenik eklem hasarı ve kemik hasarı riskini en aza indirdiği için daha üstün bir yöntem olarak öne sürülmüştür (Zahn ve ark., 2007). Dowel pin yönteminin retrograd IM pin yöntemine kıyasla daha az rijitide sağladığı, daha fazla yumuşak doku diseksiyonu gerektirdiği ve operasyon süresinin daha uzun olması gibi dezavantajlar olabilmektedir. Zira Dowel pin tekniğinin uygulanabilmesi için hem distal hem de proksimal fragmente traksiyon uygulanması gerektiği için her iki fragment, etraflarındaki kaslardan ayrılıp tamamen serbestleştirilmelidir. Retrograd pin tekniğinde ise sadece distal fragmentin etrafındaki kaslardan ayrılması proksimal fragmentin ise tutulabilecek kadar açığa çıkarılması yeterlidir. Dolayısıyla Dowel pin tekniğinin daha agresif bir cerrahi gerektirdiği düşünülmektedir. Bu nedenlerden dolayı Dowel pin yöntemi tarafımızca daha az tercih edilmektedir. Ancak bu iki yöntemin karşılaştırmasını yaparak olumlu ve olumsuz sonuçlarını ortaya koyan çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışma sonucunda kedi ve köpeklerde metakarpal ve metatarsal kırıkların tanı ve tedavilerinin değerlendirildiği özgün veriler sunuldu. Kapalı, disloke olmamış, metakarpal ve metatarsal kemiklerin yük binmeyen veya tek parmak kemiğinde olan kırıklarda konservatif tedavi uygulamalarının başarılı olabildiği ancak iki veya daha fazla kemiğin etkilendiği, disloke olmuş, yük verilen parmaklarda veya açık kırık niteliğindeki kırıklarda cerrahi yaklaşım ve osteosentez uygulamasının elzem olduğu ortaya konuldu.

### Çıkar çatışması

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

### Etik izin

Bu çalışma için Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2021/02-05 numaralı karar izin alınmıştır. Ayrıca yazarlar Araştırma ve Yayın Etiğine uyulduğunu beyan etmişlerdir.

### Benzerlik Oranı

Makalenin benzerlik oranının sisteme yüklenen raporda belirtildiği gibi %4 olduğunu beyan ederiz.

### Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: MZYD  
Tasarım: MZYD, MEA, İA  
Denetleme/Danışmanlık: MZYD, CTİ  
Veri Toplama ve/veya İşleme: MZYD, ZY, ÖK, HA, EC  
Analiz ve/veya Yorum: MZYD, İA, CTİ  
Kaynak Taraması: MZYD, İA  
Makalenin Yazımı: MZYD, İA  
Eleştirel İnceleme: MEA, CTİ

### Kaynaklar

- Aker L, 1998: Evcil karnivorlarda metakarpus ve metatarsus kırıklarının sağaltım yöntemlerine ilişkin klinik değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Altuğ ME, Deveci MZY, İşler CT, Yurtal Z, Gönenci R, 2017: Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Kliniği'ne getirilen ortopedi olgularının genel değerlendirilmesi: 564 olgu (2009-2014). *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 6 (2), 158-162.
- Baroncelli AB, Peirone B, Winter M, Reese D, Pozzi A, 2012: Retrospective comparison between minimally invasive plate osteosynthesis and open plating for tibial fractures in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 25 (05), 410-417.
- Candaş A, Sağlam M, 1990: Köpeklerde Metacarpus Ve Metatarsus Kırıklarının Transartiküler İntramedüller Pin Uygulamalarıyla Sağaltımı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 37 (1), 147-155.
- De La Puerta B, Emmerson T, Moores A, Pead M, 2008: Epoxy putty external skeletal fixation for fractures of the four main metacarpal and metatarsal bones in cats and dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 21 (05), 451-458.
- Degasperi B, Gradner G, Dupre G, 2007: Intramedullary pinning of metacarpal and metatarsal fractures in cats using a simple distraction technique. *Vet Surg*, 36 (4), 382-388.
- Deveci MZY, Gönenci R, Canpolat İ, Kanat Ö, 2020: In vivo biocompatibility and fracture healing of hydroxyapatite-hexagonal boron nitridechitosan-collagen biocomposite coating in rats. *Turk J Vet Anim Sci*, 44 (1), 76-88.
- Fitzpatrick N, Riordan JO, Smith TJ, Modlinska JH, Tucker R, Yeadon R, 2011: Combined intramedullary and external skeletal fixation of metatarsal and metacarpal fractures in 12 dogs and 19 cats. *Vet Surg*, 40 (8), 1015-1022.
- Gomaa M, El Seddawy F, Behery A, Youssef W, 2016; Different modalities of metacarpal fracture fixation in mongrel dogs: An experimental study. *Adv Anim Vet Sci*, 4 (2), 107-113.
- İşler CT, Altuğ ME, Deveci MZY, Gönenci R, Yurtal Z, 2015: Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi

- cerrahi kliniği'ne getirilen olguların değerlendirilmesi, 1293 olgu (2009-2013). *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 29 (2), 97-102
- Kapatkin A, Howe-Smith R, Shofer F, 2000: Conservative versus surgical treatment of metacarpal and metatarsal fractures in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 13 (03), 123-127.
- Kornmayer M, Failing K, Matis U, 2014: Long-term prognosis of metacarpal and metatarsal fractures in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 27 (01), 45-53.
- Kornmayer M, Matis U. 2017: Dowel pinning for metacarpal and metatarsal fractures in dogs. *Tierarztl Prax Ausg*, 45 (3), 154-162.
- Libardoni RDN, Costa DD, Menezes FB, Cavalli LG, Pedrotti LF, Kohlrausch PR, Minto BW, Silva MAM, 2018: Classification, fixation techniques, complications and outcomes of femur fractures in dogs and cats: 61 cases (2015-2016). *Cienc Rural*, 48 (6), e20170028.
- Minar M, Hwang Y, Park M, Kim S, Oh C, Choi S, Kim G, 2013: Retrospective study on fractures in dogs. *J Biomed Res*, 14 (3), 140-144.
- Muir P, Norris J, 1997: Metacarpal and metatarsal fractures in dogs. *J Small Anim Pract*, 38 (8), 344-348.
- Okumura M, Watanabe K, Kadosawa T, Fujinaga T, 2000: Surgical salvage from comminuted metatarsal fracture using a weight-bearing pin-putty apparatus in a dog. *Aust Vet J*, 78 (2), 95-98.
- Pozzi A, Hudson CC, Gauthier CM, Lewis DD, 2013: Retrospective comparison of minimally invasive plate osteosynthesis and open reduction and internal fixation of radius-ulna fractures in dogs. *Vet Surg*, 42 (1), 19-27.
- Seibert R, Lewis D, Coomer A, Sereda C, Royals S, Leasure C, 2011: Stabilisation of metacarpal or metatarsal fractures in three dogs, using circular external skeletal fixation. *N Z Vet J*, 59 (2), 96-103.
- Wernham BG, Roush JK, 2010: Metacarpal and metatarsal fractures in dogs. *Compend Contin Educ Vet*, 29, E1-7.
- Zahn K, Kornmayer M, Matis U, 2007: 'Dowel'pinning for feline metacarpal and metatarsal fractures. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 20 (04), 256-263.

\*Yazışma Adresi: Mehmet Zeki Yılmaz DEVECİ1

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye.

e-mail: zekideveci@gmail.com

## Dünyada ve Türkiye’de Hayvan Haklarının Mevcut Anayasal Konumu

Çağrı Çağlar SİNMEZ<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı, 38280, Kayseri, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-9248-6022

Geliş Tarihi: 18.01.2022

Kabul Tarihi: 21.03.2022

**Özet:** Günümüzde hayvanlara karşı kötü muamele, şiddet ve istismar vakalarının artışı hayvanlara ilişkin yasal düzenlemelerin gözden geçirilmesi ve hayvanların korunmasının anayasal güvence altına alınması fikrini ortaya çıkardı. Bu bağlamda, çalışmada, dünyada ve Türkiye’de hayvan hakları ve korunmasına ilişkin anayasa düzenlemelerini tespit etmek, bu konuda yaşanan tartışmaları bilimsel ve çağdaş anlamda karşılaştırmalı hukuk çerçevesinde değerlendirmek ve çözüm odaklı öneriler getirmek amaçlandı. Çalışmanın belgelerini, dünyada ve Türkiye’de yürürlükte olan anayasalar oluşturdu. Çalışmada elde edilen belgelere doküman incelemesi yöntemi aracılığıyla içerik analizi yapıldı. Dünyada yer alan 193 ülke içinde anayasalarında hayvan hakları ve hayvanların korunmasına ilişkin hükümler içeren 49 ülkenin yer aldığı belirlendi. Bunlardan Almanya, Avusturya, Bolivya, Brezilya, Gambiya, Güney Sudan, Hindistan, İsviçre, İzlanda, Libya, Malezya, Meksika, Mısır, Papua Yeni Gine ve Slovenya gibi ülkelerin anayasalarında hayvan haklarına ilişkin düzenlemelere yer verdikleri görüldü. Türkiye’de ise 1982 Anayasası’nda hayvan hakları ve hayvanların korunmasına ilişkin doğrudan bir hükmün olmadığı tespit edildi. Çağdaş hukuk sistemlerinde olduğu gibi Türkiye Cumhuriyeti Anayasası’nda da hayvan haklarını koruyan ve güvence altına alan hükümlere ihtiyaç duyulduğu söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Dünya anayasaları, Hayvan hakları, Hayvanların korunması, Türkiye Cumhuriyeti Anayasası.

### The Current Constitutional Position of Animal Rights in the World and Türkiye

**Abstract:** Today, the increase in cases of ill-treatment, violence, and abuse against animals has led to revising the legal regulations regarding animals and providing the protection of animals under constitutional guarantee. In this context, this study aimed to determine the constitutional rules on animal rights and protection in the world and Turkey, evaluate the debates on this subject within the framework of scientific and contemporary comparative law, and offer solution-oriented solutions suggestions. The constitutions created the study documents in force in the world and Turkey. Content analysis was performed on the documents obtained in the study through the document analysis method. Among the 193 countries in the world, it was determined that there were 49 countries with provisions on animal rights and animal protection in their constitutions. It has been seen that countries such as Germany, Austria, Bolivia, Brazil, Gambia, South Sudan, India, Switzerland, Iceland, Libya, Malaysia, Mexico, Egypt, Papua New Guinea, and Slovenia include regulations regarding the rights of animals in their constitutions. In Turkey, on the other hand, it was determined that there was no direct provision regarding animal rights and animal protection in the 1982 Constitution. It can be said that there is a need for provisions protecting and guaranteeing animal rights in the Constitution of the Republic of Turkey, as in modern legal systems.

**Keywords:** Animal protection, Animal rights, Constitution of the Republic of Turkish, World constitutions.

### Giriş

Hukuk; insanın tüm canlılarla birlikte sağlıklı, huzurlu ve güvenli bir düzen içinde yaşamasını amaçlamaktadır. Dünyada tarım toplumundan sanayi toplumuna geçiş, insanların hayvanlarla olan ilişkisinde hayvan haklarının geliştirilmesi yönünde pozitif bir değişim meydana getirmiş ve toplumlar arasında hayvanların hukuki konumu hakkında farklı görüşlerin oluşmasına neden olmuştur (Koçhisarlıoğlu ve Söğütlü Erişgin, 2013). Bu görüşler neticesinde insan haricindeki canlıların da haklarının olabileceği düşüncesi hâkim olmuş ve dünyada birçok ülkede hayvan hakları ve korunması üzerine yasal düzenlemeler gerçekleştirilmiştir (Akbulut ve Çobanoğlu, 2020; DeGrazia, 2006; Francione, 2008; Menteş Gürler ve Osmanağaoğlu, 2009; Osmanağaoğlu ve Menteş Gürler, 2009;

Regan, 2007; Singer, 2005; Yaşar ve Yerlikaya, 2004). Bu yasal düzenlemelerin yanında dünyada birçok ülke hukuki zemin içerisinde hayvanların en iyi şekilde korunması amacıyla anayasalarında da düzenleme yapmayı öngörmüşlerdir (Uran Murphy, 2019).

Anayasa hükümleri, “yasama, yürütme ve yargı organlarını, idare makamlarını ve diğer kuruluş ve kişileri bağlayan temel hukuk kurallarıdır” (Türkiye Cumhuriyeti Anayasası, 1982). Devlet teşkilatı ile temel hak ve hürriyetler açısından önemli olan konuların anayasal hükümlerle güvence altına alınmasının yararlı olacağı ileri sürülmektedir (Güneş, 2011). Bu bağlamda, anayasalarda hayvan haklarının korunmasına ilişkin hükümlerin yer alması, devletin kamu ve hukuk işleyişinde, çevre ve



sosyal politikalarında hayvan hak ihlalleri anayasal koruma altında olan diğer hakların çiğnenmesi kadar önem arz edecek (Uran Murphy, 2019) ve yasal düzenlemelere anayasal bir dayanak sağlayarak hayvanların yaşam hakkı, hayvanlara iyi davranılması ve hayvanların her türlü acı ve eziyet çekmelerinin engellenmesi bakımından önemli bir güvence oluşturacaktır (Güneş, 2011). Nitekim hayvanların haklarını korumak için yürürlükte olan yasalar, amacına ve anayasa hükümlerine ters düşmesi halinde, anayasa mahkemesi tarafından iptal edilebilecektir (Uran Murphy, 2019).

Karşılaştırmalı hukukta ülkeler, anayasalarında hayvanlara ilişkin hükümleri bazen başlangıç metni içerisinde, bazen çevre ve doğal kaynaklar, kültürel mirasın korunması veya ülkenin egemenliği kenar başlıkları altında; bazen de ulusal ekonomi, temel ilkeler veya ifade suçları kenar başlıkları altında düzenleyebilmektedirler (Sabuncu, 2003). Çalışmada, dünyadaki Birleşmiş Milletlere kayıtlı 193 ülkedeki (Birleşmiş Milletler, 2022) ve Türkiye'deki hayvan hakları ve hayvanların korunmasına ilişkin anayasal düzenlemeleri tespit etmek, hayvan haklarının korunması boyutunda yaşanan sorun, eleştiri ve tartışmaları bilimsel ve çağdaş anlamda karşılaştırmalı hukuk çerçevesinde değerlendirmek amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Çalışmanın belgelerini, dünyada ve Türkiye'de yürürlükte olan anayasalar oluşturdu. Ayrıca hayvan hakları ve korunması konusunda ulusal/uluslararası yayımlanmış bilimsel araştırmalar, makaleler ve kitaplardan yararlanıldı. Çalışmada elde edilen belgelere "*doküman incelemesi yöntemi*" aracılığıyla "*içerik analizi*" yapıldı (Yıldırım ve Şimşek, 2016). Dünya anayasalarında doğrudan hayvan haklarına ve hayvanların korunmasına ilişkin hükümlere yer veren ülkeler değerlendirildi ve elde edilen veriler ülke isimlerinin alfabetik sırasına göre Tablo 1'de düzenlendi. İlgili ülkelerin anayasa metninin künnyeleri Tablo 1 içerisinde üst indis şeklinde gösterilerek sonnot bölümünde sunuldu. Bu makalede etik kurul iznine gerek bulunmamaktadır.

## Bulgular

Dünya anayasa metinleri incelendiğinde, hayvan haklarını koruyan ve bu hakları gözetim maddelere ilkesel olarak yer veren toplam 15 ülke (Almanya, Avusturya, Bolivya, Brezilya, Gambiya, Güney Sudan, Hindistan, İsviçre, İzlanda, Libya, Malezya, Meksika, Mısır, Papua Yeni Gine, Slovenya) belirlendi (Tablo 1).

Anayasalarında hayvan türlerini (vahşi/yabani hayvanlar) korumayı ve muhafaza etmeyi taahhüt eden hükümlere yer veren toplam 34 ülke (Andora, Angola, Azerbaycan, Bahreyn, Bangladeş, Birleşik Arap Emirlikleri, Çin Halk Cumhuriyeti, Dominik Cumhuriyeti, Ekvador, Esvatini, Fildişi Sahili, Guatemala, Guyana, Haiti, Hırvatistan, İsveç, Kırgızistan, Kosova, Küba, Lao Demokratik Halk Cumhuriyeti, Litvanya, Macaristan, Makedonya, Moğolistan, Moritanya, Nepal, Nijerya, Özbekistan, Panama, Sırbistan, Slovakya, Türkmenistan, Uganda, Yemen) tespit edildi (Tablo 1).

Çalışmada, anayasalarında sadece çevrenin, ormanların ve biyoçeşitliliğin korunmasına ilişkin hükümlere yer veren toplam 78 ülke (Arjantin, Arnavutluk, Belarus, Bhutan, Bulgaristan, Burundi, Cezayir, Çad, Çek Cumhuriyeti, Demokratik Kongo Cumhuriyeti, Ekvator Ginesi, El Salvador, Eritre, Ermenistan, Estonya, Etiyopya, Fiji, Filipinler Sahili, Finlandiya, Fransa, Gabon, Gana, Gambiya, Güney Kore, Gürcistan, Irak, İran, İspanya, İtalya, Kamerun, Karadağ, Katar, Kenya, Kolombiya, Komorlar, Kongo, Kosta Rika, Kuzey Kore, Lesotho, Letonya, Libya, Lüksemburg, Maldivler, Malavi, Mali, Moldovya, Mozambik, Myanmar, Nabibya, Nikaragua, Nijer, Paraguay, Peru, Polonya, Romanya, Ruanda, Rusya, Sao Tome, Senegal, Seyşeller, Somali, Sri Lanka, Sudan, Surinam, Suriye, Suudi Arabistan, Şili, Tayland, Tayvan, Togo, Türkiye, Ukrayna, Umman, Venezuela, Vietnam, Yeşil Burun Adaları, Yunanistan, Zambiya) belirlenmiş olup ilgili tabloda değerlendirilmeye alınmadı.

## Tartışma ve Sonuç

Menteş (1996), doktora tezinde 20 ülkede hayvanların korunması ile ilgili yasa ve yönetmeliklerin yürürlükte olduğunu ancak anayasal düzeyde düzenlemelerin olmadığını bildirmektedir. Çalışma verilerine göre ise günümüzde dünyada yer alan 193 ülke içinde anayasalarında hayvan hakları ve hayvanların korunmasına ilişkin hükümler içeren 49 ülkenin (dünya ülkelerinin yaklaşık ¼'ü) olduğu görülmektedir. Bu ülkelerden başta Avusturya, Bolivya, Brezilya, Gambiya, Güney Sudan, Hindistan, İsviçre, İzlanda, Libya, Malezya, Meksika, Mısır, Papua Yeni Gine ve Slovenya anayasalarında hayvan haklarından açıkça bahsetmesi ve ilkesel olarak hayvan haklarını koruyan hükümlere (zulüm, istismar ve kötü muameleyle karşı koruma, hayvanların onuru ve güvenliğine karşı saygı göstermek vb.) yer vermesi (Tablo 1) hayvan hakları adına atılan çok önemli bir adım olarak değerlendirilebilir.

Tablo 1. Anayasalarında hayvan hakları ve hayvanların korunmasına ilişkin hükümlere yer veren ülkeler.

	Ülke	Anayasa madde/leri	Anayasa Hüküm/leri İçerikleri
Anayasalarında Hayvan Haklarına İlişkin Hükümler İçeren Ülkeler	Almanya	m.20a <sup>1</sup>	Devlet, gelecek nesillerin çıkarı için hayvanları anayasal kanunlar çerçevesinde ve kanunlar, yönetmelikler ve yargı kararları aracılığıyla korur.
	Avusturya	m.11/1(8) <sup>2</sup>	Hayvanlar, avcılık ve balıkçılık uygulamaları hariç olmak üzere diğer yasal hükümlere göre korunur.
	Bolivya	m.189(1),302(5),381(1) <sup>3</sup>	Devlet, hayvanların korunması için gerekli önlemleri almaktan sorumlu tutulmuştur.
	Brezilya	m.24(VI),225§1e(VII) <sup>4</sup>	Anayasada, hayvan türlerinin soyunun tükenmesine engel olacağı ve hayvanları eziyete tabi kılan uygulamaların yasaklanacağı hükme bağlanmıştır.
	Gambiya	m.254(1)-e,254(4)-b <sup>5</sup>	Devlet, istismar ve kötü muamelele karşı koruma da dâhil olmak üzere hayvanların korunması ve refahı için ulusal kanunlarında hükümler getirecektir.
	Güney Sudan	m.37/2(b),157(2),157(7)-a,157(8) <sup>6</sup>	Vahşi yaşamın korunması, nesli tükenmekte olan türlerin korunması ve muhafazası hükme bağlanmıştır.
	Hindistan	m.48,48A,51A(g) <sup>7</sup>	İnek, diğer süt veren ve yük taşıyan büyükbaş hayvanların ve vahşi yaşamın korunması, şartlarının iyileştirilmesi ve kesimlerinin engellenmesi, canlı varlıklara şefkat gösterilmesi ve hayvanlara zulmün önlenmesi hükümleri yer almaktadır.
	İsviçre	m.78,79,80,120(2) <sup>8</sup>	Hayvan yaşamının korunması, nesli tükenmekte olan türlerin yok olmaktan korunması; balık türlerinin, vahşi memelilerin ve kuşların çeşitliliğinin korunması, canlıların onuru, hayvanların güvenliğine saygı göstermek ve hayvan ve türlerinin genetik çeşitliliğini korumak güvence altına alınmıştır.
	İzlanda	m.36 <sup>9</sup>	Anayasa, hayvanların istismara karşı korunmasını ve nesli tükenmekte olan hayvan türlerinin korunmasını sağlamaktadır.
	Libya	m.190 <sup>10</sup>	Devlet, hayvan ve deniz kaynaklarının ve soylarının korunmasını sağlamakla görevlidir.
	Malezya	m.74,73 <sup>11</sup>	Vahşi yaşamın, vahşi kuşların ve hayvancılığın korunması, hayvanlara zulmün önlenmesi hükümleri yer almaktadır.
	Meksika	m.122(V)-I <sup>12</sup>	Anayasa, temsilciler meclisini hayvanların korunmasını sağlamakla yetkilendirmiştir.
	Mısır	m.30,45 <sup>13</sup>	Devletin, hayvancılığın ve balıkçılığın korunması, nesli tükenmekte olan türlerin korunması ve hayvanlara zulmün önlenmesini taahhüt etmekle görevli olduğu hükme bağlanarak hayvan hakları anayasal güvence altına alınmıştır.
	Anayasalarında Hayvanların Korunmasına İlişkin Hükümler İçeren Ülkeler	Papua Yeni Gine	m.4 <sup>14</sup>
Slovenya		m.72 <sup>15</sup>	Anayasa, hayvanların zalimane davranışlardan korunmasını sağlar.
Andora		m.31 <sup>16</sup>	Anayasa, hayvanların ve ekolojik dengenin korunmasını temin etmekle yükümlüdür.
Angola		m.39 <sup>17</sup>	Anayasa, hayvan türleri ve ekolojik dengenin korunmasını sağlar.
Azerbaycan		m.39(IV) <sup>18</sup>	Devlet, yabani hayvan türleri ve ekolojik dengenin korunmasını garanti eder.
Bahreyn		m.9 <sup>19</sup>	Devlet, vahşi yaşamın korunması için gerekli tedbirleri alır.
Bangladeş		m.18A <sup>20</sup>	Devlet, yaban hayatı, biyoçeşitlilik ve ormanların korunmasını sağlayacaktır.
Birleşik Arap Emirlikleri		m.121 <sup>21</sup>	Devlet, hayvan varlıklarının korunmasında yasama yetkisine sahiptir.
Çin Halk Cumhuriyeti		m.9 <sup>22</sup>	Devlet, nadir hayvan türlerini korur.
Dominik Cumhuriyeti		m.16,66 <sup>23</sup>	Devlet, yaban hayatı, ekolojik denge ve hayvan türlerini korur.
Ekvador		m.14 <sup>24</sup>	Devlet, hayvanları, ekosistemleri ve biyoçeşitliliği korur.
Esvatini (Svaziland Krallığı)		m.210(2) <sup>25</sup>	Devlet, hayvan türlerini koruyacaktır.
Fildişi Sahili		m.40 <sup>26</sup>	Devlet, hayvan türlerini korumak için gerekli önlemleri alır.
Guatemala		m.9 <sup>27</sup>	Devlet, hayvan türlerini ve ekolojik dengiyi korumak için gerekli önlemleri alır.
Guyana		m.36 <sup>28</sup>	Devlet, hayvan ve eko-sistemlerin zenginliğini muhafaza eder.
Haiti		m.253,257 <sup>29</sup>	Ekolojik denge ve hayvan türlerine ilişkin koruma koşullarını ve cezaları kanunlar belirler.
Hırvatistan		m.52 <sup>30</sup>	Hayvan türleri, ormanlar ve çevre koruma altına alınmıştır.
İsveç		m.2 <sup>31</sup>	Anayasa, medyada hayvanlara yönelik şiddete karşı koruma sağlar. Hayvan türlerinin korunması söz konusu olduğunda basın özgürlüğüne izin verilmez.
Kırgızistan		m.48(3),12(5) <sup>32</sup>	Herkes çevreyi ve hayvan türlerini önemsemelidir. Hayvanlar, ormanlar ve çevre Devletin özel koruması altındadır.
Kosova		m.52 <sup>33</sup>	Devlet, hayvan türlerini korumakla görevlidir.
Küba		m.27 <sup>34</sup>	Devlet ve halk, hayvan türlerini ve çevreyi korumakla görevlidir.
Lao Demokratik Halk Cumhuriyeti		m.17,19 <sup>35</sup>	Su yaşamı, vahşi yaşam, ormanlar ve biyolojik çeşitlilik koruma altına alınmıştır.
Litvanya		m.54 <sup>36</sup>	Devlet, yabani hayvanları korumak ve bakımını yerine getirmekle sorumludur.
Macaristan		m.P(1) <sup>37</sup>	Devlet ve her kişi, yerli hayvan türlerini korumakla görevlidir.
Makedonya		m.56 <sup>38</sup>	Hayvan türleri Devletin özel koruması altındadır.
Moğolistan		m.6 <sup>39</sup>	Hayvan türleri ve ormanlar halkın otoritesi ve Devletin koruması altındadır.
Moritanya		m.57 <sup>40</sup>	Hayvan türleri kanunların korunması altındadır.
Nepal		m.51g(5) <sup>41</sup>	Hayvan türleri ve ormanların korunması Devletin güvencesi altındadır.
Nijerya	m.20 <sup>42</sup>	Devlet, vahşi yaşam ve ormanların muhafaza edilmesini sağlar.	
Özbekistan	m.55 <sup>43</sup>	Hayvan türleri devlet tarafından korunacaktır.	
Panama	m.296 <sup>44</sup>	Avcılık, balıkçılık, ormanların işletilmesi ve hayvan türlerinin korunmasına özel özen gösterilir.	
Sırbistan	m.97(9) <sup>45</sup>	Devlet, hayvan türlerinin korunmasını sağlamakla sorumludur.	
Slovakya	m.44(4) <sup>46</sup>	Devlet, orman, ekolojik denge ve vahşi hayvan türlerinin korunmasını sağlar.	
Türkmenistan	m.14 <sup>47</sup>	Devlet, hayvan türlerinin korunmasını sağlar.	
Uganda	m.27 <sup>48</sup>	Devlet, hayvan türlerinin ve biyoçeşitliliğin korunmasını sağlar.	
Yemen	m.40,379,382,383 <sup>49</sup>	Devlet, balık popülasyonunun korunması, aşırı avlanmanın önlenmesi ve göçmen kuşları içeren biyolojik çeşitliliğin korunmasını sağlamakla görevlidir.	

Diğer ülkelerden 34'ünün (Tablo 1) anayasalarında hayvan türlerinin (vahşi/yabani) korunması ile ilgili hükümlere yer vermelerinin önem arz eden başka bir gelişme olduğu söylenebilir.

Hukuk toplum davranış ve inançlarını sınırlandırdığı ve yansıttığı için hayvan kimliğinin ve varlığının yasal temellere dayanması hayvan hakları mücadelesinde çok önemli bir mihenk taşı olmuştur (Evans, 2010). Bu canlı varlığın tanınma mücadelesinin sonucunda, XX. yüzyılın sonundan günümüze Avrupa'da hayvan kimliği anayasalarda kabul görmeye başlamıştır (Köybaşı, 2018). Nitekim Alman Anayasasının ilgili maddesiyle (Tablo 1) birlikte hayvanların korunması, devletin anayasa güvencesi altına girerek devlet kurumları için hukuken bağlayıcı ve sorumluluklar getiren anayasal bir ilke haline gelmiştir (Güneş, 2009). Federal Alman Anayasasına hayvanların korunmasına ilişkin maddenin girmesiyle özellikle uluslararası liderlere ve kanun koyuculara hayvan haklarını koruyan kanunların yapılması ödevi yüklenmiştir. Dahası Almanya hayvan koruma topluluklarının bu kazanımı, küresel hayvan hakları topluluklarını da cesaretlendirmiştir (Natrass, 2004; İnce, 2017). Natrass (2004), Almanya'da hayvanların zarar görmemesi için hayvan çıkarlarının insan çıkarlarına karşı eşit olarak tartışılabileceği bir anayasal mekanizma oluşturduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde, Avusturya Anayasasında hayvan haklarını koruyan maddelere (Tablo 1) ilkesel olarak yer verilmiştir (Uran Murphy, 2019). Almanya ve Avusturya örneğinde olduğu gibi hayvanların anayasal koruma altına alınması hayvanların korunmaya değer menfaatleri olduğunun çağdaş hukuk sistemlerince kabul edildiğini göstermesi bakımından değerli olduğu ileri sürülebilir.

İsviçre'de hayvan haklarının ve hayvan onuru kavramının anayasaya dâhil edilmesi hayvan hakları konusunda görülen en önemli gelişmelerden biri olmuştur (Evans, 2010). Hayvanların "*kendi içsel değerinin, kendisi için korunması*" olarak tanımlanan bu kavram, 1992 yılında İsviçre Anayasa'sında "*canlı varlığın onuru*" (m.120/2) adı altında düzenlenerek anayasada bir değer olarak kabul edilmiştir. Söz konusu hüküm gereğince, İsviçre Federal Yüksek Mahkemesi vereceği hukuki kararlarda hayvanların çıkarlarını korumakla mükellef tutulmuştur. Böylece İsviçre, patosentrik bir hayvan refahı yaklaşımından, hayvanlarla ilgili davaların yorumlanma biçimine açık bir damga vuran canlı varlığın onuru temelli bir hayvan koruma görüşünü kabul etmiştir (Bolliger, 2016). Eisen (2017)'e göre, hayvanların anayasaya dâhil edilmesi, hayvan onuru kavramının hayvan yaşamının özünde hukukla ilişkili olduğu fikrinin kodlanmış halidir. Bu gelişmeler ışığında, İsviçre Anayasası'nda olduğu gibi, Türkiye Cumhuriyeti Anayasası'nın (1982) 2. maddesine hayvan onurunu

koruma altına alan özerk bir hükmün eklenmesi önerilebilir.

Türkiye'de hayvanların korunmasına ilişkin başlıca mevzuat hükümlerinden (anayasa, kanunlar ve uluslararası sözleşmeler) bazıları doğrudan, bazıları ise dolaylı olarak koruma sağlamaktadır. Bunlardan Türk Anayasası'nda (1982) hayvan hakları ve korunmasına ilişkin doğrudan bir hüküm bulunmaması Türk hukuku açısından önemli bir eksiklik (Uyumaz, 2016). Ancak, Anayasanın 56(1,2). maddesine göre, "*Herkes, sağlıklı ve dengeli bir çevrede yaşama hakkına sahiptir. Çevreyi geliştirmek, çevre sağlığını korumak ve çevre kirlenmesini önlemek Devletin ve vatandaşların ödevidir*" hükmü yer almaktadır. Güneş'e göre (2011), bu maddede çevre hakkından söz edilmeyip, yaşam hakkı vurgulanmaktadır. Dadak (2016), Anayasanın 56. maddesinde çevre hakkı konusunun, yaşamın içinde gerçekleşen çevre olduğunu; amacı da insanların ve tüm canlı varlıkların yaşadığı yer olan çevrenin korunması olduğunu ifade etmektedir. Yılmaz (2006) ise sağlıklı ve dengeli bir çevreyle, hem insanların hem de hayvanların korunabileceğini, bu bakımdan Anayasanın 56. maddesinde hayvan haklarını içeren bir hükme yer verildiğini bildirmektedir. Buradan çevre hakkının düzenlendiği bu maddeyle kısmen de olsa hayvan haklarına ve korunmasına yer verildiği sonucuna dolaylı biçimde varıldığı söylenebilir.

Uyumaz (2016), Anayasa'nın "*Ormanların Korunması ve Geliştirilmesi*" başlıklı 169'uncu maddesinin orman alanlarının ve ormanlarda yaşayan hayvanların korunması bakımından değerli bir düzenleme olduğunu ileri sürmektedir. Bu madde; "*Devlet, ormanların korunması ve sahaların genişletilmesi için gerekli kanunları koyar ve tedbirleri alır. Ormanlara zarar verebilecek hiçbir faaliyet ve eyleme müsaade edilemez*" hükmünü içermektedir. Bu maddeden hareketle, Anayasada, ormanların ağaçlarla birlikte temiz hava, su, toprak, bitki örtüsü ve hayvan topluluklarından oluştuğu ifade edilmektedir. Dolayısıyla hayvanlar ekolojik dengenin sağlanmasında önemli bir faktör olarak kabul edilmekte ve çevrenin sahipleri arasında yer almaktadır (Yılmaz, 2006). Bu bağlamda, Anayasanın 169'uncu maddesinin ormanlar içinde yaşayan hayvanların korunmasını sağlayan ve ormanlara zarar veren faaliyetlerin hayvanlara da zarar vereceğini kabul ederek bu durumu yasaklayan bir hükme yer verdiği söylenebilir.

Hayvanların anayasal düzeyde korunması, hayvanların çıkarlarının insanlara verilen temel hak ve özgürlüklerle aynı düzeyde değerlendirilmesi manasına gelmektedir. Bu durumda devlet erkinin, bir hayvanın çıkarının bir insan çıkarıyla çatışmaya girdiği anlaşmazlıklarda insan haklarının

sınırlandırılmasında hukuki bir temel oluşturulabilmektedir (Çelebi, 2018). Anayasal korumalar sonuç itibarıyla yeni yasaları kendiliğinden kanunlaştıramaz; ancak mevcut yasalar Anayasa Mahkemesi tarafından anayasaya aykırılık nedeniyle iptal edilebilir. Benzer şekilde Anayasa Mahkemeleri hayvan çıkarlarının için anayasal değere sahip olduğu yönünde kararlar verebilirler (Eisen, 2017). Anayasalarında hayvan hakları ile ilgili hükümlere yer veren Almanya, Brezilya, Hindistan, İsviçre gibi ülkelerin Anayasa Mahkemeleri, anayasalarda yer alan bilim, sanat ve din gibi konulardaki hak ve özgürlükler arasında bir ihtilaf olduğunda, insan çıkarına ilkesel ölçüde öncelik verilmesinin anayasaya aykırı düştüğü ve hayvanların çıkarlarının ve haklarının dikkate alınması yönünde yorumlar yaparak çarpıcı kararlar verdiği görülmektedir (Uran Murphy, 2019). Bu ülkelerin Anayasa Mahkemeleri örneğin geleneksel ve kültürel olarak yapılan rodeo etkinliklerini, boğa güreş/devirme gösteri/festivallerini, yunus parklarını veya bazı hayvan deneylerini anayasayı ihlal ettiğini gerekçe göstererek yasaklama kararı almıştır (Köybaşı, 2018; Uran Murphy, 2019). Türkiye Cumhuriyeti Anayasası'nın (1982) "Anayasaya aykırılığın diğer mahkemelerde ileri sürülmesi" başlıklı 152. maddesi, Kanunların veya Cumhurbaşkanlığı Kararnamelerinin anayasaya aykırılığını mahkemelerde ileri sürülmesi usulü olan itiraz yolunu düzenlemiştir. Bu bağlamda, günümüzde hayvan hukukunun ilerleme ve gelişme eğilimi ile ihtiyacı düşünüldüğünde Türk Anayasasında hayvan hakları ve korunmasına ilişkin doğrudan hüküm/lerin yer alması gerektiği söylenebilir. Bu geniş çaplı sosyal dönüşümün sağlanabilmesi ancak bireysel, toplumsal, hukuksal ve siyasal bir birlikteliğin (Çiğcı, 2019) sonucunda mümkün olabilecektir.

Yukarıda bahsedilen yorumlar yerine, devletin hayvan haklarına ve hayvanları koruyucu görevine vurgu yapan bir hükme anayasada doğrudan ve açıkça yer vermesi kuşkusuz daha isabetli ve yararlı olacaktır. Bu doğrultuda, Anayasanın 2. maddesine "Türkiye Cumhuriyeti, toplumun huzuru, milli dayanışma ve adalet anlayışı içinde, insan haklarına, hayvan haklarına, canlıların onuruna ve çevreye saygılı, Atatürk milliyetçiliğine bağlı, başlangıçta belirtilen temel ilkelere dayanan, demokratik, laik ve sosyal bir hukuk Devletidir" ya da Anayasanın 56. maddesine "Herkes, sağlıklı ve dengeli bir çevrede yaşama hakkına sahiptir. Çevreyi geliştirmek, çevre sağlığını, doğal hayatı ve hayvanları (haklarını) korumak ve çevre kirlenmesini önlemek Devletin ve vatandaşların ödevidir....." şeklinde eklemesi yapılması önerilebilir.

Bunların dışında, hayvanların çıkarlarını önemseyen; hayvanların insanlar gibi acı ve hazzı

duyarlı ya da insanlar gibi bir hayatın öznesi olabilen canlılar olarak gören; yalnızca insanlar için var olduğu yönündeki geleneksel görüşü reddeden; devletin tüm hayvanların (yabani veya evcil, sahipli veya sahipsiz) haklarının ve onurunun korunmasını sağlayacağı ve hayvanlara karşı eziyet ve zalimce davranışların yapılmamasının güvence altına alınacağı ve dahası hayvanın eşya statüsü yerine hak öznesi/kişi olarak kabul edileceği bir hükmün anayasada ayrı bir madde olarak düzenlenmesi toplumun beklentilerini karşılamak adına daha faydalı olacaktır. Sonuç olarak, Türk kanun koyucusu, Anayasada hayvan hakları ve korunmasına ilişkin bir hüküm koyarak insan, hayvan ve çevreye bir bütün olarak saygı duyan çağdaş hukuk anlayışını benimsediğini göstermelidir.

### Çıkar çatışması

Yazar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

### Etik izin

Bu çalışma için etik kurul iznine gerek yoktur. Ayrıca yazar Araştırma ve Yayın Etiğine uyulduğunu beyan etmiştir.

### Benzerlik Oranı

Makalenin benzerlik oranının sisteme yüklenen raporda belirtildiği gibi %10 olduğunu beyan ederim.

### Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: ÇÇS

Tasarım: ÇÇS

Denetleme/Danışmanlık: ÇÇS

Veri Toplama ve/veya İşleme: ÇÇS

Analiz ve/veya Yorum: ÇÇS

Kaynak Taraması: ÇÇS

Makalenin Yazımı: ÇÇS

Eleştirel İnceleme: ÇÇS

### Sonnot

1. The Constitution of Germany, Erişim Tarihi; 02.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/German\\_Federal\\_Republic\\_2014.pdf?lang=en./](https://constituteproject.org/constitution/German_Federal_Republic_2014.pdf?lang=en/).
2. The Constitution of Austria, Erişim Tarihi; 02.04.2021, [https://www.constituteproject.org/constitution/Austria\\_2009.pdf](https://www.constituteproject.org/constitution/Austria_2009.pdf).
3. The Constitution of Bolivia, Erişim Tarihi; 02.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Bolivia\\_2009.pdf?lang=en./](https://constituteproject.org/constitution/Bolivia_2009.pdf?lang=en./).

- 4.The Constitution of Brazil, Erişim Tarihi; 02.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Brazil\\_2017.pdf?lang=en/](https://constituteproject.org/constitution/Brazil_2017.pdf?lang=en/).
- 5.The Constitution of Gambia, Erişim Tarihi; 07.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Gambia\\_2020D.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Gambia_2020D.pdf?lang=en).
- 6.The Constitution of South Sudan, Erişim Tarihi; 07.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/South\\_Sudan\\_2013.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/South_Sudan_2013.pdf?lang=en).
- 7.The Constitution of India, Erişim Tarihi; 09.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/India\\_2016.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/India_2016.pdf?lang=en).
- 8.The Constitution of Switzerland, Erişim Tarihi; 11.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Switzerland\\_2014.pdf?lang=en/](https://constituteproject.org/constitution/Switzerland_2014.pdf?lang=en/).
- 9.The Constitution of Iceland, Erişim Tarihi; 11.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Iceland\\_2011D.pdf?lang=en/](https://constituteproject.org/constitution/Iceland_2011D.pdf?lang=en/).
- 10.The Constitution of Libya, Erişim Tarihi; 11.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Libya\\_2016D.pdf?lang=en/](https://constituteproject.org/constitution/Libya_2016D.pdf?lang=en/).
- 11.The Constitution of Malaysia, Erişim Tarihi; 12.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Malaysia\\_2007.pdf?lang=en/](https://constituteproject.org/constitution/Malaysia_2007.pdf?lang=en/).
- 12.The Constitution of Mexico, Erişim Tarihi; 12.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Mexico\\_2015.pdf?lang=en/](https://constituteproject.org/constitution/Mexico_2015.pdf?lang=en/).
- 13.The Constitution of Egypt, Erişim Tarihi; 12.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Egypt\\_2019.pdf?lang=en/](https://constituteproject.org/constitution/Egypt_2019.pdf?lang=en/).
- 14.The Constitution of Papua New Guinea, Erişim Tarihi; 14.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Papua\\_New\\_Guinea\\_2016.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Papua_New_Guinea_2016.pdf?lang=en).
- 15.The Constitution of Slovenia, Erişim Tarihi; 15.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Slovenia\\_2016.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Slovenia_2016.pdf?lang=en).
- 16.The Constitution of Andorra, Erişim Tarihi; 02.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Andorra\\_1993.pdf?lang=en/](https://constituteproject.org/constitution/Andorra_1993.pdf?lang=en/).
- 17.The Constitution of Angola, Erişim Tarihi; 02.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Angola\\_2010.pdf?lang=en/](https://constituteproject.org/constitution/Angola_2010.pdf?lang=en/).
- 18.The Constitution of Azerbaijan, Erişim Tarihi; 02.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Azerbaijan\\_2016.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Azerbaijan_2016.pdf?lang=en).
- 19.The Constitution of Bahrain, Erişim Tarihi; 02.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Bahrain\\_2017.pdf?lang=en/](https://constituteproject.org/constitution/Bahrain_2017.pdf?lang=en/).
- 20.The Constitution of Bangladesh, Erişim Tarihi; 02.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Bangladesh\\_2014.pdf?lang=en/](https://constituteproject.org/constitution/Bangladesh_2014.pdf?lang=en/).
- 21.The Constitution of United Arab Emirates, Erişim Tarihi; 02.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/United\\_Arab\\_Emirates\\_2009.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/United_Arab_Emirates_2009.pdf?lang=en).
- 22.The Constitution of China, Erişim Tarihi; 04.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/China\\_2018.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/China_2018.pdf?lang=en).
- 23.The Constitution of Dominican Republic, Erişim Tarihi; 04.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Dominican\\_Republic\\_2015.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Dominican_Republic_2015.pdf?lang=en).
- 24.The Constitution of Ecuador, Erişim Tarihi; 04.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Ecuador\\_2015.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Ecuador_2015.pdf?lang=en).
- 25.The Constitution of Swaziland, Erişim Tarihi; 04.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Swaziland\\_2005.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Swaziland_2005.pdf?lang=en).
- 26.The Constitution of Côte d'Ivoire, Erişim Tarihi 04.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Cote\\_Divoire\\_2016.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Cote_Divoire_2016.pdf?lang=en).
- 27.The Constitution of Guatemala, Erişim Tarihi; 07.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Guatemala\\_1993.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Guatemala_1993.pdf?lang=en).
- 28.The Constitution of Guyana, Erişim Tarihi; 07.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Guyana\\_2016.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Guyana_2016.pdf?lang=en).
- 29.The Constitution of Haiti, Erişim Tarihi; 09.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Haiti\\_2012.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Haiti_2012.pdf?lang=en).
- 30.The Constitution of Croatia, Erişim Tarihi; 11.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Croatia\\_2013.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Croatia_2013.pdf?lang=en).
- 31.The Constitution of Sweden, Erişim Tarihi; 11.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Sweden\\_2012.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Sweden_2012.pdf?lang=en).
- 32.The Constitution of Kyrgyzstan, Erişim Tarihi; 11.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Kyrgyz\\_Republic\\_2016.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Kyrgyz_Republic_2016.pdf?lang=en).
- 33.The Constitution of Kosovo, Erişim Tarihi; 12.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Kosovo\\_2016.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Kosovo_2016.pdf?lang=en).
- 34.The Constitution of Cuba, Erişim Tarihi; 12.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Cuba\\_2019.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Cuba_2019.pdf?lang=en).
35. The Constitution of Lao People's Democratic Republic, Erişim Tarihi; 12.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Laos\\_2015.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Laos_2015.pdf?lang=en).
- 36.The Constitution of Lithuania, Erişim Tarihi; 12.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Lithuania\\_2019.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Lithuania_2019.pdf?lang=en).
- 37.The Constitution of Hungary, Erişim Tarihi; 12.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Hungary\\_2016.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Hungary_2016.pdf?lang=en).
- 38.The Constitution of Macedonia, Erişim Tarihi; 12.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Macedonia\\_2011.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Macedonia_2011.pdf?lang=en).
- 39.The Constitution of Mongolia, Erişim Tarihi; 14.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Mongolia\\_2001.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Mongolia_2001.pdf?lang=en).

- 40.The Constitution of Mauritania, Erişim Tarihi; 14.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Mauritania\\_2012.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Mauritania_2012.pdf?lang=en).
- 41.The Constitution of Nepal, Erişim Tarihi; 14.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Nepal\\_2016.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Nepal_2016.pdf?lang=en).
- 42.The Constitution of Nigeria, Erişim Tarihi; 14.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Nigeria\\_2011.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Nigeria_2011.pdf?lang=en).
- 43.The Constitution of Uzbekistan, Erişim Tarihi; 14.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Uzbekistan\\_2011.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Uzbekistan_2011.pdf?lang=en).
- 44.The Constitution of Panama, Erişim Tarihi; 14.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Panama\\_2004.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Panama_2004.pdf?lang=en).
- 45.The Constitution of Serbia, Erişim Tarihi; 15.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Serbia\\_2006.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Serbia_2006.pdf?lang=en).
- 46.The Constitution of Slovakia, Erişim Tarihi; 15.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Slovakia\\_2017.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Slovakia_2017.pdf?lang=en).
- 47.The Constitution of Turkmenistan, Erişim Tarihi; 15.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Turkmenistan\\_2016.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Turkmenistan_2016.pdf?lang=en).
- 48.The Constitution of Uganda, Erişim Tarihi; 15.04.2021, [https://constituteproject.org/constitution/Uganda\\_2017.pdf?lang=en](https://constituteproject.org/constitution/Uganda_2017.pdf?lang=en).
- 49.The Constitution of Yemen, Erişim Tarihi; 16.04.2021, [https://www.constituteproject.org/constitution/Yemen\\_2015D.pdf?lang=en](https://www.constituteproject.org/constitution/Yemen_2015D.pdf?lang=en).
- Evans E, 2010: Constitutional inclusion of animal rights in Germany and Switzerland: How did animal protection become an issue of national importance? *Soc Anim*, 18, 231-250.
- Francione GL, 2008: Hayvan Haklarına Giriş: Çocuğunuz mu Köpeğiniz mi? çev. R. Akman, E. Gen, İletişim Yayınları, İstanbul.
- Güneş AM, 2009: Alman çevre hukukunun anayasal çerçevesi. *Ankara Üniv Hukuk Fak Derg*, 58 (4), 777-824.
- Güneş AM, 2011: Yeni anayasa tartışmaları bağlamında çevre. *Gazi Üniv Hukuk Fak Derg*, 15 (3), 259-284.
- İnce N, 2017: Alman hukukunda veteriner hekimin aydınlatma yükümlülüğü. *İnönü Üniv Hukuk Fak Derg*, 8 (2), 515-550.
- Koçhisarlıoğlu C, Söğütlü Erişgin Ö, 2013: Hayvanın hukuki konumu. *Yaşar Üniv Derg*, 8 (Özel Sayı), 1691-1724.
- Köybaşı S, 2018: Yeni bir anayasal hak öznesi olarak hayvan-I. *Anayasa Hukuku Derg*, 7 (13), 103-156.
- Menteş A, 1996: Türk veteriner hekimliği tarihinde dentoloji, ülkemizde ve dünyada bugünkü durum. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Menteş Gürler A, Osmanağaoğlu Ş, 2009: Türkiye'de hayvanları koruma kanununun tarihsel gelişimi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 15 (3), 325-330.
- Nattrass KM, 2004: Und die tiere constitutional protection for Germany's animals. *Anim Law*, 10, 283-312.
- Osmanağaoğlu Ş, Mentesh Gürler A, 2009: Eski Anadolu ve Yakınoğu Uygarlıklarında veteriner hekimliği ve hayvanlara ilişkin yasal düzenlemeler. *Vet Bil Derg*, 25 (1-2), 5-8.
- Regan T, 2007: Kafesler Boşalsın: Hayvan Haklarıyla Yüzleşmek. çev. S. Çağlayan, İletişim Yayınları, İstanbul.
- Sabuncu Y, 2003: Anayasaya Giriş. İmaj Yayınevi, Ankara.
- Singer P, 2005: Hayvan Özgürleşmesi. çev. H. Doğan, Ayrıntı Yayınları, İstanbul.
- Türkiye Cumhuriyeti Anayasası, 1982: <https://www.mevzuat.gov.tr/MevzuatMetin/1.5.2709.pdf>, Erişim tarihi; 15.06.2021.
- Uran Murphy P, 2019: Hayvanların anayasal çerçevede korunması. *Akademik Sosyal Araş Derg*, 88, 252-275.
- Uyumaz A, 2016: Bir hukuk sorunsalı olarak güncel gelişmeler ışığında Türkiye'de hayvan hakları. *Gazi Üniv Hukuk Fak Derg*, 20 (3), 133-184.
- Yaşar A, Yerlikaya H, 2004: Dünyada ve Türkiye'de hayvan haklarının tarihsel gelişimi. *Eurasian J Vet Sci*, 20 (4), 39-46.
- Yıldırım A, Şimşek H, 2016: Sosyal bilimlerde nitel araştırma yöntemleri. Seçkin Yayıncılık, Ankara.
- Yılmaz H, 2006: Hayvan haklarına bakış. *Türkiye Barolar Birliği Derg*, 62, 212-229.

## Kaynaklar

- Akbulut O, Çobanoğlu N, 2020: Türk hukukunda hayvanların korunmasına ilişkin yasal mevzuat ve bu mevzuata göre hayvanların hukuki durumları. *SD Sosyal Bil Enst Derg*, 36, 1-37.
- Birleşmiş Milletler, 2022: Üye devletler. <https://www.un.org/en/about-us/member-states>, Erişim tarihi; 23.02.2022.
- Bolliger G, 2016: Legal protection of animal dignity in Switzerland: Status quo and future perspectives. *Anim Law*, 22, 311-395.
- Çelebi Ö, 2018: Kişi ve eşya ayrımı bağlamında hayvanların hukuki statüsü. *İstanbul Hukuk Mecmuası*, 76(2), 559-622.
- Çiğcı M, 2019: Avrupa insan hakları mahkemesi kararları ışığında temel hak ve özgürlükler açısından hayvanların hukuki durumu. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, İstanbul.
- Dadak K, 2016: Yeni kuşak hak olarak çevre hakkı. *Uyumsuzluk Mahkemesi Derg*, 5, 309-326.
- DeGrazia D, 2006: Hayvan Hakları. Dostkitabevi Yayınları, Ankara.
- Eisen J, 2017: Animals in the constitutional state. *Int J Const Law*, 15 (4), 909-954.

## \*Yazışma Adresi: Çağrı Çağlar SİNMEZ

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı, 38280, Kayseri, Türkiye  
e-mail: cagribey6038@hotmail.com

## DeneySEL Akut Pankreatit Oluşturulan Ratlarda Lipit Profil Üzerine Timokinonun Etkileri

Sevim KANAÇ<sup>1,a</sup>, Deniz ULUIŞIK<sup>2,b,\*</sup>, Ercan KESKİN<sup>2,c</sup>

<sup>1</sup>Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi Hastanesi, Konya, Türkiye.

<sup>2</sup>Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-4935-0883; <sup>b</sup>ORCID: 0000-0003-1462-0836;

<sup>c</sup>ORCID: 0000-0003-3839-0414

Geliş Tarihi: 02.02.2022

Kabul Tarihi: 19.04.2022

**Özet:** Çalışmada serulein ile akut pankreatit oluşturulan ratlarda timokinonun lipit profil üzerine olası etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma süresi olan 9 gün boyunca kontrol grubuna (K) herhangi bir uygulama yapılmadı. Timokinon grubundaki (TQ) hayvanlara 9 gün süre ile günde 20 mg/kg timokinon intraperitoneal olarak verilirken, akut pankreatit grubundaki (AP) hayvanlarda araştırmanın 7. gününde 50 µg/kg ve 2 saat sonra 25 µg/kg seruleinin intraperitoneal olarak uygulanmasıyla akut pankreatit oluşturuldu. Akut pankreatit+timokinon grubunda ise (AP+TQ) günde 20 mg/kg olmak üzere 9 gün süre ile intraperitoneal olarak timokinon verilen hayvanlarda araştırmanın 7. gününde timokinon uygulamasından 2 saat sonra 50 µg/kg ve bundan 2 saat sonra 25 µg/kg seruleinin intraperitoneal olarak uygulanmasıyla akut pankreatit oluşturuldu. Bütün hayvanlardan alınan kan örneklerinde Lipaz, Amilaz, Trigliserit, Total Kolesterol, Düşük dansiteli lipoprotein (LDL-kolesterol) ve Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL-kolesterol) düzeyleri belirlendi. DeneySEL akut pankreatit oluşturulan ratlarda amilaz ve lipaz düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi (p<0.05). Akut pankreatit oluşturulan grupta yüksek olan bu enzim düzeylerinin timokinon uygulanan akut pankreatitli ratlarda önemli oranda baskılandığı belirlendi (p<0.05). Çalışmada serulein ile oluşturulan deneySEL akut pankreatite bağlı olarak plazma trigliserit ve total kolesterol düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli oranda yüksek olduğu belirlendi (p<0.05). Akut pankreatitli ratlarda LDL-kolesterol düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek bulunurken (p<0.05), HDL-kolesterol düzeylerinin akut pankreatitli gruba göre anlamlı oranda düşük olduğu belirlendi (p<0.05). Sonuç olarak, plazma lipit parametreleri ve bazı enzim düzeylerindeki farklılıklar dikkate alındığında timokinonun akut pankreatit üzerine olumlu etkileri olduğu kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Lipit profil, Rat, Serulein, Timokinon

### Effects of Thymoquinone on Lipid Profile in Rats with Experimentally Acute Pancreatitis

**Abstract:** This study aimed to determine the possible effects of thymoquinone on lipid profile in rats with cerulein-induced acute pancreatitis. No application was made to the control group (K) during the study period of nine days. The thymoquinone group (TQ) animals were administered 20 mg/kg of thymoquinone daily for nine days. In the acute pancreatitis group (AP), acute pancreatitis was induced by intraperitoneal cerulein administration of 50 µg/kg and 2 hours later, 25 µg/kg on the seventh day of the study. Animals in the acute pancreatitis+thymoquinone group (AP+TQ) were intraperitoneally administered 20 mg/kg of thymoquinone daily for nine days. On the seventh day of the study, acute pancreatitis was induced by intraperitoneal administration of 50 µg/kg and 2 hours later 25 µg/kg of cerulein after 2 hours from thymoquinone administration. In blood samples taken from all animals, Lipase, Amylase, Triglyceride, Total Cholesterol, low-density lipoprotein (LDL-cholesterol), and high-density lipoprotein (HDL-cholesterol) levels were determined. The amylase and lipase levels of rats with acute experimental pancreatitis were significantly higher than the control group (p<0.05). It was determined that these enzyme levels, which were high in the acute pancreatitis group, were significantly suppressed in rats with acute pancreatitis treated with thymoquinone (p<0.05). The increase in plasma triglyceride and total cholesterol levels due to acute experimental pancreatitis induced with cerulein was significant compared to the control group (p<0.05). LDL-cholesterol level of rats with acute pancreatitis was found to be significantly higher than the control group (p<0.05), while HDL-cholesterol level was significantly lower (p<0.05). The total cholesterol and LDL-cholesterol levels of rats with acute pancreatitis treated with thymoquinone were significantly lower than those of the acute pancreatitis group (p<0.05). In conclusion, in light of differences in plasma lipid parameters and some enzyme levels, it was considered that thymoquinone has positive effects on acute pancreatitis.

**Keywords:** Cerulein, Lipid profile, Rats, Thymoquinone

### Giriş

Akut pankreatit hücre içi sindirim enzimlerinin aktivasyonuna bağlı olarak pankreas dokusunun

kendi kendini sindirmesiyle karakterize bir hastalıktır. Bu enzimlerin etkinleşmesi pankreas



dokusunda çabuk gelişen bir yangıya yol açar (Crockett ve ark., 2018). Pankreas dokusundaki hücrelerin hasar görmesinde etkili olan faktörler arasında aşırı alkol tüketimi, safra yolu tıkanmaları ve viral enfeksiyonlar yer alırlar (Van Dijk ve ark., 2017). Akut nekrotize pankreatitinin mortalite oranının % 17-20 arasında olduğu bildirilmektedir (Negi ve ark., 2018). Akut pankreatit proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve substans P gibi mediatörlerin salınımına neden olan asiner hücre hasarıyla başlatılmaktadır (Leema ve Tamizhselvi, 2018; Velusamy ve Tamizhselvi, 2018). TNF- $\alpha$  akut pankreatitte doku nekrozuna neden olan başlıca faktör olarak değerlendirilmektedir (Song ve ark., 2016; Werlang ve ark., 2017; Velusamy ve Tamizhselvi, 2018; Kumar ve Tamizhselvi, 2020). Antioksidan durumun bozulması ve paroxanaz (PON)-1 gibi bazı enzimlerin salınımindaki değişikliklerin akut pankreatitte plazma lipit profilinde olumsuz değişikliklere yol açtığı bildirilmektedir (Sweiry ve Mann, 1996; Andican ve ark., 2005; Tvarijonaviciute ve ark., 2015). Deneysel akut pankreatitte PON-1 aktivitesinin ve serum HDL-kolesterol düzeyinin azaldığı ileri sürülmektedir. PON-1 aktivitesi ve HDL-kolesterol düzeyi LDL-kolesterol düzeyi ile negatif ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Bu hastalıkta LDL-kolesterol ve MDA düzeylerinin de önemli oranda arttığı bildirimler arasındadır (Schoenberg ve ark., 1995). PON-1 aktivitesinin trigliserit düzeyi ile pozitif ilişkili olduğu ve trigliserit düzeyindeki artışın akut pankreatitin şiddetinin belirlenmesinde bir gösterge olarak değerlendirildiği bildirilmektedir (Pădureanu ve ark., 2022; Tvarijonaviciute ve ark., 2015).

Timokinon, nigella sativa (çörek otu) tohumlarından elde edilen fitokimyasal bir bileşiktir. Son zamanlardaki çalışmalar timokinonun antiülserojenik, antitümöral, nöroprotektif ve antioksidan etkiler gibi çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu yönünde bulgular sunmaktadır (Ashraf ve ark., 2011; Nagi ve ark., 2010; Radad ve ark., 2009). Timokinonun antioksidan kapasite üzerine olan olumlu etkileri antioksidan enzimlerin aktivitesini artırmasına ve güçlü serbest radikal temizleyici özelliğine atfedilmektedir (Badary ve ark., 2003). Ayrıca timokinonun antiinflamatuvar etkisinin de antioksidan durumu düzeltmesinde katkısı olduğu ileri sürülmektedir (Abdel-Daim ve ark., 2020).

Literatürde çörek otunun kan lipit düzeyleri üzerine etkinliğini değerlendiren çalışmalar mevcut olup çörek otunun hipolipidemik etkisinden söz edilmektedir (El-Dakhkhny ve ark., 2000; Najmi ve ark., 2008; Zaoui ve ark., 2002). Genetik olarak hiperlipidemik bir rat türü olan Spontaneously Hypertensive Stroke Prone Ratlarda 4 hafta boyunca 800 mg/kg çörek otu yağı kullanılması sonucu total

kolesterol, trigliserit ve LDL-kolesterol düzeylerinin anlamlı oranda düştüğü, serum HDL-kolesterol düzeyinin ise anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir (El-Dakhkhny ve ark., 2000). Bir diğer çalışmada çörek otunun lipit profili üzerinde olumlu etkileri olduğu, serum trigliserit ve LDL-kolesterol düzeylerini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Al-Naqeep ve ark., 2011). Nader ve ark. (2010)'nın kolesterolce zengin diyet ile besledikleri tavşanlarda timokinonun HDL-kolesterol konsantrasyonunu arttırdığını, total kolesterol, LDL-kolesterol ve trigliserit düzeylerini anlamlı bir şekilde azalttığını bildirmişlerdir. İki ay süre ile 1 g çörek otu tohumu verilen yüksek kolesterolü hastalarda LDL-kolesterol ve trigliserit düzeyinin anlamlı oranda düştüğü, HDL-kolesterol düzeyinin arttığı görülmüştür (Bhatti ve ark., 2009). Benzer olarak, çörek otunun hiperkolesterolemik tavşanlarda lipit profili üzerinde olumlu etki gösterdiği ifade edilmiştir (Asgary ve ark., 2013). Yapılan bir çalışmada 4 hafta süre ile 100, 200, 400 ve 600 mg/kg/gün çörek otu tozu verilen ratların hepsinde total kolesterol çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL-kolesterol) ve trigliserit düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte 200 ve 600 mg/kg/gün çörek otu tozu alan grupların LDL-kolesterol düzeylerinde anlamlı düzeyde bir azalma saptanırken HDL-kolesterol düzeylerinde fark bulunamamıştır (Kocyigit ve ark., 2009). Ayrıca timokinonun kan lipitlerini regüle ettiği, plazma kolesterol, glikoz ve trigliserit oranlarını azalttığı, kan basıncını düşürürken solunumu hızlandırdığı da bildirimler arasındadır (Darakhshan ve ark., 2015; Güllü ve Gülcan, 2013; Vardar ve ark., 2018).

Bu çalışmada serulein ile deneysel akut pankreatit oluşturulan ratlarda çörek otu tohumundan elde edilen timokinonun oksidatif stres markırları ve lipit parametreleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Araştırmada sağlıklı 32 yetişkin erkek Wistar Albino rat kullanıldı. Bu çalışma protokolünü Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurulu (Rapor no. 2019-30) onayladı. Araştırma süresi boyunca ratlar için öngörülen yaşam şartları (ısı, nem ve ışık) sağlandı. Hayvanlar dört gruba ayrıldı. Bütün hayvanlar çalışma başlangıcından önce 16 saat süre ile aç bırakılırken, su içmelerine izin verildi. Kontrol grubuna (K, n=6) herhangi bir uygulama yapılmadı. Timokinon grubundaki (TQ, n=6) hayvanlara 9 gün süre ile günde 0,3 ml %10'luk DMSO'da çözödürülen 20 mg/kg timokinon (Samarghandian ve ark., 2015) (#T0795, Tokyo Chemical Industry: TCI, Japan) intraperitoneal olarak verilirken, akut pankreatit grubundaki (AP,

n=10) hayvanlarda araştırmanın 7. gününde 50 µg/kg ve 2 saat sonra 25 µg/kg seruleinin intraperitoneal olarak uygulanmasıyla akut pankreatit oluşturuldu. Akut pankreatit+timokinon grubunda ise (AP+TQ, n=10) 9 gün süre ile günde 0,3 ml %10'luk DMSO'da çözdürülen, intraperitoneal olarak 20 mg/kg timokinon verilen hayvanlarda araştırmanın 7. gününde timokinon uygulamasından 2 saat sonra 50 µg/kg ve bundan 2 saat sonra 25 µg/kg seruleinin intraperitoneal olarak uygulanmasıyla akut pankreatit oluşturuldu.

Çalışmanın 9. gününün sonunda bütün gruplardaki hayvanlardan anestezi altında (60 mg/kg ketamin) uygun yöntemle kalpten yeterli oranda alınan kan örneklerinin santrifüj ile plazmaları ayrılarak bunlarda Lipaz, Amilaz, Trigliserit, Total Kolesterol, LDL-kolesterol ve HDL-kolesterol düzeyleri Siemens Centaur CP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA) marka cihazda Siemens kitleri kullanılarak belirlendi. Kan alma işlemi bittikten sonra hayvanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Çalışmada elde edilen veriler SPSS 19.0 istatistik programı yardımıyla One-Way ANOVA testi ve ardından çoklu karşılaştırma testlerinden Duncan testiyle analiz edilerek grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri istatistiksel yöntemlerle belirlendi.

## Bulgular

Çalışmada serulein ile oluşturulan akut pankreatitli ratlara timokinon uygulamasının Lipaz ve Amilaz düzeyleri Tablo 1'de, Trigliserit, Total Kolesterol, LDL-kolesterol ve HDL-kolesterol düzeyleri ise Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Serulein ile oluşturulan akut pankreatitli ratlarda Lipaz ve Amilaz düzeyleri üzerine timokinonun etkileri (Mean±SE).

	Lipaz (U/L)	Amilaz (U/L)
K (n=6)	17,67±0,88 <sup>c</sup>	562,17±30,32 <sup>c</sup>
TQ (n=6)	16,83±1,08 <sup>c</sup>	541,83±34,71 <sup>c</sup>
AP (n=10)	71,30±4,07 <sup>a</sup>	1686,20±46,82 <sup>a</sup>
AP+TQ (n=10)	49,10±3,18 <sup>b</sup>	974,60±42,95 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup>Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0.05)

Mevcut çalışmada amilaz ve lipaz düzeyleri deneysel akut pankreatit oluşturulan ratlarda kontrol grubu değerlerine göre anlamlı olarak artış gösterdi (p<0.05, Tablo 1). Akut pankreatit oluşturulan grupta belirlenen bu enzimlerin düzeylerindeki artışın timokinon uygulamasıyla birlikte önemli oranda azaltıldığı belirlenmiştir (p<0.05, Tablo 1). Çalışmada serulein ile oluşturulan deneysel akut pankreatite bağlı olarak plazma

trigliserit ve total kolesterol düzeylerinde kontrol grubuna göre belirlenen artış istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.05, Tablo 2). Diğer yandan akut pankreatitle birlikte plazma LDL-kolesterol düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı oranda artarken, HDL-kolesterol düzeyi ise anlamlı oranda düşük bulundu (p<0.05, Tablo 2). Mevcut çalışmada akut pankreatit oluşturulan ratlara timokinon uygulaması ile akut pankreatitli gruba göre plazma trigliserit düzeyi istatistiksel olarak farklı değilken, plazma total kolesterol düzeyinin anlamlı oranda azaldığı belirlendi (p<0.05, Tablo 2). Akut pankreatit oluşturulan ratlara timokinon uygulamasına bağlı olarak plazma LDL-kolesterol düzeyi akut pankreatitli gruba göre önemli oranda düşük bulunurken (p<0.05, Tablo 2), HDL-kolesterol düzeyinde önemli bir farklılık belirlenmedi.

## Tartışma ve Sonuç

Son yıllarda akut pankreatit dünya genelinde insidansı artan bir hastalık olarak değerlendirilmektedir (Roberts ve ark., 2017). Her yıl akut hospitalizasyon gerektiren gastrointestinal hastalıklar arasında yaygın olarak görülmektedir. Akut pankreatit lokal ve sistemik yangısal yanıt sendromuna neden olan inflamatuvar süreçlerle karakterize bir hastalıktır. Akut pankreatitli hastaların büyük bir çoğunluğunda hastalık ılımlı bir seyir izlerken, %20'sinde orta ve şiddetli pankreatit gelişebilmektedir. Bu son grupta pankreatik doku nekrozu ve/veya çoklu organ yetmezliği görülebilmektedir (Banks ve ark., 2006; Van Dijk ve ark., 2017). Son yıllarda birçok çalışmada enfeksiyöz hastalıklardan kardiyovasküler sistem hastalıklarına kadar geniş bir spektrumda nigella sativa tohumlarından elde edilen timokinonun yararlı etkiler gösterdiğine ilişkin bulgular elde edilmiştir (Shabana ve ark., 2013; Woo ve ark., 2012).

Amilaz ve lipaz enzimlerinin düzeyindeki artış akut pankreatitin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Ismail ve Bhayana, 2017). Akut pankreatitte bu sindirici enzim düzeylerindeki artış pankreatik inflamatuvar süreçlerin aktivasyonundan ve pankreatik asiner hücrelerin erken yıkım safhalarından sorumlu olarak tutulmaktadır (Ikei ve ark., 1998). Mevcut çalışmada akut pankreatitin belirlenmesi için pankreatik biyomarkırlardan olan amilaz ve lipaz düzeyleri deneysel akut pankreatit oluşturulan ratlarda kontrol grubu değerlerine göre anlamlı olarak artış gösterdi (p<0.05, Tablo 1). Bu sindirici enzimlerin inhibisyonunun akut pankreatit ve buna ilişkin organ hasarlarını azaltacağı literatürde bildirilmiştir (Bansod ve ark., 2021; Schmidt ve ark., 1992). Mevcut çalışmada akut pankreatit oluşturulan grupta belirlenen bu enzimlerin düzeylerindeki

**Tablo 2.** Serulein ile oluşturulan akut pankreatitli ratlarda Trigliserit, Total Kolesterol, LDL-kolesterol ve HDL-kolesterol düzeyleri üzerine timokinonun etkileri (Mean±SE).

	Trigliserit (mg/dl)	Total Kolesterol (mg/dl)	LDL-kolesterol (mg/dl)	HDL-kolesterol (mg/dl)
<b>K (n=6)</b>	78,33±4,81 <sup>b</sup>	101,17±5,72 <sup>b</sup>	39,83±2,89 <sup>b</sup>	47,50±2,79 <sup>a</sup>
<b>TQ (n=6)</b>	74,50±3,18 <sup>b</sup>	97,67±5,02 <sup>b</sup>	37,67±2,47 <sup>b</sup>	49,83±3,47 <sup>a</sup>
<b>AP (n=10)</b>	96,40±4,88 <sup>a</sup>	126,10±2,86 <sup>a</sup>	52,70±2,84 <sup>a</sup>	35,20±3,67 <sup>b</sup>
<b>AP+TQ (n=10)</b>	85,20±4,90 <sup>ab</sup>	108,90±4,86 <sup>b</sup>	40,60±4,11 <sup>b</sup>	43,80±3,52 <sup>ab</sup>

<sup>a-c</sup>Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0.05)

artışın timokinon uygulamasıyla birlikte önemli oranda azaltıldığı belirlenmiştir (p<0.05, Tablo 1). Bu sonuç timokinonun seruleine bağlı akut pankreatite karşı koruyucu etkiye sahip olduğunun bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Çalışmada elde edilen bu sonuçlar, timokinon uygulamasının seruleine bağlı akut pankreatitte amilaz ve lipaz enzimlerinde görülen olumsuz değişiklikleri hafifletmesi ve pankreası koruması açısından güçlü bir yardımcı olabileceği kanaatini oluşturmuştur.

Çalışmada serulein ile oluşturulan deneysel akut pankreatite bağlı olarak plazma trigliserit ve total kolesterol düzeylerinde kontrol grubuna göre belirlenen artış istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.05, Tablo 2). Diğer yandan akut pankreatitle birlikte plazma LDL-kolesterol düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı oranda artarken, HDL-kolesterol düzeyi ise anlamlı oranda düşük bulundu (p<0.05, Tablo 2). Literatürde, mevcut çalışmadaki bulgulara paralel olarak akut pankreatitli vakalarda trigliserit düzeyinin istatistiksel olarak sağlıklı bireylere göre anlamlı oranda yüksek bulunduğu bildirilmiştir (Dominguez-Munoz ve ark., 1991; Clemens ve Mahan, 2010; Okura ve ark., 2004). Akut pankreatitte trigliserit düzeyindeki artıştan iki olgunun sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Bunlardan ilki pankreatitli gruplardaki tiroit stimulan hormon (TSH) düzeyinin önemli oranda yüksek olduğu ve TSH'daki geçici ve minimal bir artışın (minimal tiroit disfonksiyonu) trigliserit düzeyindeki artışa yardımcı olabileceğidir. TSH düzeyindeki değişikliklerin akut pankreatit atağı süresince salınan sitokinlerin etkisine bağlı olabileceği bu olayın da sistemik olarak tiroit bezi ya da sentral sinir sistemi üzerine etkisinden kaynaklanabileceği ifade edilmektedir (Unal ve ark., 2005; Weidner ve ark., 1991). İkinci olarak pankreatitli vakalarda HDL-kolesterol düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük bulunduğu ifade edilirken, akut pankreatit vakalarında HDL-kolesterol düzeylerinin düştüğü deneysel olarak da gösterilmiştir (Unal ve ark., 2005; Weidner ve ark., 1991). Düşük HDL-kolesterol

düzeylerinin de lipoprotein lipaz aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak trigliserit parçalanmasında düşüşe neden olduğu ileri sürülmüştür (Baggio ve ark., 1986; Bugdaci ve ark., 2011). Yüksek serum trigliserit ve düşük serum HDL-kolesterol düzeylerinin bir diğer açıklaması olarak TLR reseptörleri ve özellikle TLR-4 ekspresyonu ileri sürülmektedir. Akut pankreatitli vakalarda TLR-4 ekspresyonunun muhtemel olarak proinflamatuvar sitokin salınımının artmasında rolü olabileceği ve bunun da çoklu organ yetmezliklerinin gelişiminde etkili olabileceği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2010). TLR-4 ekspresyonunun stimüle edilmesinin trigliserit düzeyini artırdığı, HDL-kolesterol düzeyini ise baskıladığı rapor edilmiştir (Liao ve ark., 1999). Çalışmada akut pankreatitle birlikte HDL-kolesterol ve trigliserit düzeylerinde belirlenen değişiklikler yukardaki ifade edilen bulguları destekler niteliktedir.

Doymamış yağ asitleri, pankreatik lipazların trigliseritlerin ester bağlantılarını hidrolize ederek visceral yağların lipolizisine yol açması ile oluşurlar. Doymamış yağ asitlerindeki artışın pankreatik nekroz ve inflamatuvar yanıtta bağımsız olarak orta derecede akut pankreatitin şiddetli akut pankreatite dönüşümüne yol açabileceği bildirilmektedir (Patel ve ark., 2015). Adipoz dokunun yaklaşık %90'ı trigliseritlerden oluşmaktadır. Pankreatit esnasında salınan lipazlarla bu trigliseritler hidrolize edilirler. Böylece serbest yağ asitleri miktarı yükselir (Lam ve ark., 2007; Zechner ve ark., 2009). Yüksek trigliserit düzeyleri ve serbest yağ asitlerinin pankreatik asiner hücrelerdeki hasarı artırdığı ve toksik etkiler bakımından yüksek bir risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür (Wang ve ark., 2009). Hiperlipideminin serulein ile oluşturulan akut pankreatitte protein kinaz C aktivasyonu ile ilişkili olarak hastalığı kötüleştirdiği bildirimler arasındadır (Wan ve ark., 2017; Wang ve ark., 2006).

Apolipoprotein A1 (Apo A1), HDL-kolesterolün en büyük protein komponentidir. Apo A1, aşırı kolesterolün karaciğer dışı dokulardan karaciğere

taşınması ve kolesterol homeostazisinde esansiyel bir rol oynar. Ayrıca Apo A1'in antiinflamatuar etkilere sahip olduğuna yönelik bildirimler söz konusudur (Emancipator ve ark., 1992; Flegel ve ark., 1993). Sitokin düzeylerindeki artışların Apo A1 ve HDL-kolesterolün hepatik sentezini baskıladığı bildirilmektedir (Ettinger ve ark., 1994; Peng ve ark., 2015). Bu çalışmada akut pankreatitli grupta belirlenen yüksek total kolesterol düzeyinin nedeni, serulein ile oluşturulan akut pankreatit nedeniyle gelişen inflamasyon ve sitokin artışına bağlı olarak HDL-kolesterol sentezinin baskılanması ve kolesterol transportunda oluşan aksaklıklar olarak değerlendirilmiştir.

Mevcut çalışmada akut pankreatit oluşturulan ratlara timokinon uygulaması ile plazma trigliserit düzeyi akut pankreatitli gruba göre bir miktar düşüş göstermekle birlikte belirlenen bu değişiklik istatistiksel olarak farklı değildi. Akut pankreatitli ratlara timokinon uygulamasıyla birlikte plazma total kolesterol düzeyinin akut pankreatitli gruba göre anlamlı oranda azaldığı belirlendi ( $p < 0.05$ , Tablo 2). Akut pankreatit oluşturulan ratlara timokinon uygulamasına bağlı olarak plazma LDL-kolesterol düzeyi akut pankreatitli gruba göre önemli oranda düşük bulunurken ( $p < 0.05$ , Tablo 2), HDL-kolesterol düzeyinde önemli bir farklılık belirlenmedi. Nigella sativa uygulamasının plazma total lipit, trigliserit ve LDL-kolesterol düzeylerini azalttığı, buna karşılık HDL-kolesterol düzeyini ise artırdığı bildirimler arasındadır (Gholamnezhad ve ark., 2016; Qidwai ve Ashfaq, 2014). Nigella sativanın bu olumlu etkilerinden timokinon, timol, lipaz ve tanenler yanında doymamış yağ asitlerinin de sorumlu olabileceği iddia edilmektedir (Najmi ve ark., 2012). Bir diğer çalışmada hiperlipidemik hastalara nigella sativa tohumu uygulanmasıyla total kolesterol, LDL-kolesterol ve trigliserit düzeylerinin düştüğü, açlık glikoz düzeyi ile HDL-kolesterol düzeyi üzerine herhangi bir etki yapmadığı belirtilmektedir (Sabzghabae ve ark., 2012). Nigella sativa yağı verilen metabolik sendromu olan hastalarda açlık kan glikozu ile total kolesterol ve LDL-kolesterol seviyelerinin düzeldiği belirtilmektedir. Bu bulguların nigella sativanın hiperlipidemik ve hiperglisemik hastalarda terapötik bir ajan olarak kullanılabileceğini gösterdiği ileri sürülmüştür (Najmi ve ark., 2008). Aşırı kilolu insanlara nigella sativa tozu uygulamasının total kolesterol, LDL-kolesterol ve trigliserit düzeylerini düşürdüğü, HDL-kolesterol düzeyini ise artırdığı bulgular arasındadır (Farzaneh ve ark., 2014). Timokinonun hipolipidemik etkilerine ilişkin olarak eriyebilir lifler, steroller, flavonoidler ve poliunsature yağ asitlerinin sinerjik etki yapabileceği ileri sürülmüştür (Gholamnezhad ve ark., 2016; Ibrahim ve ark., 2014).

İlave olarak diyabetik ratlarda timokinon uygulamasının hipokolesterolemik etki gösterdiği bildirilirken, bunu başlıca iki mekanizma yoluyla gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür. Bu mekanizmalardan birincisi LDL-kolesterol reseptörünün hepatik upregülasyonu yoluyla LDL-kolesterol alımının artması, diğer mekanizma ise 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A redüktaz (HMG-CoAR) geninin baskılanması ile olabileceği belirtilmektedir (Al-Naqeep ve ark., 2009). Ratlarda yapılan diğer bir çalışmada, timokinonun HMG-CoAR aktivitesini azaltmak yoluyla kardiyovasküler hastalık riskini önlediği ileri sürülmüştür. Böylece timokinonun koruyucu olarak aterosklerotik problemler ve hiperlipidemide kullanılabileceği iddia edilmektedir (Ahmad ve Beg, 2013). Doxorubisin ile oluşturulan hiperlipidemik nefropatili ratlarda timokinonun serum trigliserit ve total kolesterol düzeylerini düşürebildiği ve böbreklerdeki lipit peroksidasyonunu önleyebildiği bildirimler arasındadır (Badary ve ark., 2000). Bütün bu sonuçlar birlikte ele alındığında timokinonun hiperlipidemi/dislipidemi tedavisi ile bunlara ilişkin komplikasyonlarda destekleyici bir rol üstlenebileceği iddia edilmiştir (Darakhshan ve ark., 2015). Nigella sativa yağı uygulamasının ratlarda plazma lipit düzeylerini düşürücü etkiye sahip olduğu bildirilirken (Zaoui ve ark., 2002), timokinon uygulamasının farelerde (Pakala ve ark., 2005) ve ratlarda (Bamosa ve ark., 2002) HDL-kolesterol dahil total kolesterol, trigliserit ve LDL-kolesterol düzeyleri üzerine düşürücü etkiye sahip olduğu bildirimler arasındadır (Ragheb ve ark., 2008).

Bu çalışmada akut pankreatitli ratlara timokinon ön uygulamasının plazma lipit parametreleri üzerine olan olumlu etkileri göz önüne alındığında akut pankreatitte antihiperlipidemik etkilere sahip olduğu görüşüne varılmıştır.

## Teşekkür

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19202065 proje numarası ile desteklenmiştir. Destekleri için kuruma teşekkür ederiz

## Etik İzin

Bu çalışma protokolünü Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurulu (Rapor no. 2019-30) onayladı. Ayrıca yazarlar Araştırma ve Yayın Etiğine uyulduğunu beyan etmişlerdir.

## Benzerlik Oranı

Makalenin benzerlik oranı %13'tür.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: DU, EK

Tasarım: DU, EK

Denetleme/Danışmanlık: DU, EK

Veri Toplama ve/veya İşleme: SK, DU, EK

Analiz ve/veya Yorum: SK, DU, EK

Kaynak Taraması: SK, DU, EK

Makalenin Yazımı: SK, DU, EK

Eleştirel İnceleme: SK, DU, EK

## Kaynaklar

- Abdel-Daim MM, Abo El-Ela FI, Alshahrani FK, Bin-Jumah M, Al-Zharani M, Almutairi B, Alyousif MS, Bungau S, Aleya L, Alkahtani S, 2020: Protective effects of thymoquinone against acrylamide-induced liver, kidney and brain oxidative damage in rats. *Environ Sci Pollut Res Int*, 27 (30), 37709-37717. doi: 10.1007/s11356-020-09516-3.
- Ahmad S, Beg ZH, 2013: Hypolipidemic and antioxidant activities of thymoquinone and limonene in atherogenic suspension fed rats. *Food Chem*, 138 (2-3), 1116-1124.
- Al-Naqeep G, Al-Zubairi AS, Ismail M, Amom ZH, Esa NM, 2011: Antiatherogenic potential of Nigella sativa seeds and oil in diet-induced hypercholesterolemia in rabbits. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 213628. doi: 10.1093/ecam/nea071.
- Al-Naqeep G, Ismail M, Allaudin Z, 2009: Regulation of low-density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression by thymoquinone-rich fraction and thymoquinone in HepG2 cells. *Lifestyle Genomics*, 2 (4-5), 163-172.
- Andican G, Gelisgen R, Unal E, Tortum OB, Dervisoglu S, Karahasanoglu T, Burçak G, 2005: Oxidative stress and nitric oxide in rats with alcohol-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*, 11 (15), 2340-2345. doi: 10.3748/wjg.v11.i15.2340.
- Asgary S, Ghannadi A, Dashti G, Helalat A, Sahebkar A, Najafi S, 2013: Nigella sativa L. improves lipid profile and prevents atherosclerosis: Evidence from an experimental study on hypercholesterolemic rabbits. *J Funct Foods*, 5 (1), 228-234.
- Ashraf SS, Rao MV, Kaneez FS, Qadri S, Al-Marzouqi AH, Chandranath IS, Adem A, 2011: Nigella sativa extract as a potent antioxidant for petrochemical-induced oxidative stress. *J Chromatogr Sci*, 49 (4), 321-326. doi: 10.1093/chrs/49.4.321.

- Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FM, 2000: The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology*, 143 (3), 219-226.
- Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH, 2003: Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol*, 26 (2), 87-98. doi: 10.1081/dct-120020404.
- Baggio G, Manzato E, Gabelli C, Fellin R, Martini S, Enzi GB, Verlato F, Baiocchi M, Sprecher D, Kashyap M, 1986: Apolipoprotein C-II deficiency syndrome. Clinical features, lipoprotein characterization, lipase activity, and correction of hypertriglyceridemia after apolipoprotein C-II administration in two affected patients. *J Clin Invest*, 77 (2), 520-527.
- Bamosa A, Ali BA, Al-Hawsawi ZA, 2002: The effect of thymoquinone on blood lipids in rats. *Indian J Physiol Pharmacol*, 46 (2), 195-201.
- Banks PA, Freeman ML, 2006: Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol*, 101 (10), 2379-2400.
- Bansod S, Chilvery S, Saifi MA, Das TJ, Tag H, Godugu C, 2021: Borneol protects against cerulein-induced oxidative stress and inflammation in acute pancreatitis mice model. *Environ Toxicol*, 36 (4), 530-539.
- Bhatti IU, Rehman FU, Khan MA, Marwat SK, 2009: Effect of prophetic medicine Kalonji (Nigella sativa L.) on lipid profile of human beings: an in vivo approach. *World Appl Sci J*, 6 (8), 1053-1057.
- Bugdaci MS, Sokmen M, Zuhur SS, Altuntas Y, 2011: Lipid profile changes and importance of low serum  $\alpha$ -lipoprotein fraction (high-density lipoprotein) in cases with acute pancreatitis. *Pancreas*, 40 (8), 1241-1244.
- Clemens DL, Mahan KJ, 2010: Alcoholic pancreatitis: Lessons from the liver. *World J Gastroenterol: WJG*, 16 (11), 1314-1320.
- Crockett SD, Wani S, Gardner TB, Falck-Ytter Y, Barkun AN, 2018: American Gastroenterological Association Institute Clinical Guidelines Committee. American Gastroenterological Association Institute Guideline on Initial Management of Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*, 154 (4), 1096-1101. doi: 10.1053/j.gastro.2018.01.032.
- Darakhshan S, Pour AB, Colagar AH, Sisakhtnezhad S, 2015: Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacol Res*, 95, 138-158.
- Dominguez-Munoz J, Malfertheiner P, Ditschuneit H, Blanco-Chavez J, Uhl W, Bückler M, Ditschuneit H, 1991: Hyperlipidemia in acute pancreatitis. *Int J Pancreatol*, 10 (3), 261-267.
- El-Dakhkhny M, Mady NI, Halim MA, 2000: Nigella sativa L. oil protects against induced hepatotoxicity and improves serum lipid profile in rats. *Arzneimittelforschung*, 50 (9), 832-836.
- Emancipator K, Csako G, Elin R, 1992: In vitro inactivation of bacterial endotoxin by human lipoproteins and apolipoproteins. *Infect Immun*, 60 (2), 596-601.
- Ettinger WH, Varma VK, Sorci-Thomas M, Parks JS, Sigmon RC, Smith TK, Verdery RB, 1994: Cytokines decrease

- apolipoprotein accumulation in medium from Hep G2 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 14 (1), 8-13.
- Farzaneh E, Nia FR, Mehtash M, Mirmoeini FS, Jalilvand M, 2014: The effects of 8-week *Nigella sativa* supplementation and aerobic training on lipid profile and VO2 max in sedentary overweight females. *Int J Prev Med*, 5 (2), 210.
- Flegel W, Baumstark M, Weinstock C, Berg A, Northoff H, 1993: Prevention of endotoxin-induced monokine release by human low-and high-density lipoproteins and by apolipoprotein AI. *Infect Immun*, 61 (12), 5140-5146.
- Gholamnezhad Z, Havakhah S, Boskabady MH, 2016: Preclinical and clinical effects of *Nigella sativa* and its constituent, thymoquinone: A review. *J Ethnopharmacol*, 190, 372-386.
- Güllü EB, Gülcan A, 2013: Timokinon: *Nigella Sativa*'nın biyoaktif komponenti. *Kocatepe Vet Derg*, 6 (1), 51-61.
- Ibrahim RM, Hamdan NS, Mahmud R, Imam MU, Saini SM, Abd Rashid SN, Abd Ghafar SA, Ab Latiff L, Ismail M, 2014: A randomised controlled trial on hypolipidemic effects of *Nigella Sativa* seeds powder in menopausal women. *J Transl Med*, 12 (1), 1-7.
- Ikei S, Ogawa M, Yamaguchi Y, 1998: Blood concentrations of polymorphonuclear leucocyte elastase and interleukin-6 are indicators for the occurrence of multiple organ failures at the early stage of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 13 (12), 1274-1283.
- Ismail OZ, Bhayana V, 2017: Lipase or amylase for the diagnosis of acute pancreatitis? *Clin Biochem*, 50 (18), 1275-1280.
- Kocuyigit Y, Atamer Y, Uysal E, 2009: The effect of dietary supplementation of *Nigella sativa* L. on serum lipid profile in rats. *Saudi Med J*, 30 (7), 893-896.
- Kumar MM, Tamizhselvi R, 2020: Protective effect of diallyl disulfide against cerulein-induced acute pancreatitis and associated lung injury in mice. *Int Immunopharmacol*, 80, 106136. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106136.
- Lam PP, Cosen Binker LI, Lugea A, Pandolfi SJ, Gaisano HY, 2007: Alcohol redirects CCK-mediated apical exocytosis to the acinar basolateral membrane in alcoholic pancreatitis. *Traffic*, 8 (5), 605-617.
- Leema G, Tamizhselvi R, 2018: Protective Effect of Scopoletin Against Cerulein-Induced Acute Pancreatitis and Associated Lung Injury in Mice. *Pancreas*, 47 (5), 577-585. doi: 10.1097/MPA.0000000000001034.
- Liao W, Rudling M, Angelin B, 1999: Endotoxin suppresses mouse hepatic low-density lipoprotein-receptor expression via a pathway independent of the toll-like receptor 4. *Hepatology*, 30 (5), 1252-1256.
- Nader MA, El-Agamy DS, Suddek GM, 2010: Protective effects of propolis and thymoquinone on development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arch Pharm Res*, 33 (4), 637-643.
- Nagi MN, Almakki HA, Sayed-Ahmed MM, Al-Bekairi AM, 2010: Thymoquinone supplementation reverses acetaminophen-induced oxidative stress, nitric oxide production and energy decline in mice liver. *Food Chem Toxicol*, 48 (8-9), 2361-2365. doi: 10.1016/j.fct.2010.05.072.
- Najmi A, Nasiruddin M, Khan R, Haque SF, 2012: Therapeutic effect of *Nigella sativa* in patients of poor glycemic control. *Asian J Pharm Clin Res*, 5 (3), 224-228.
- Najmi A, Nasiruddin M, Khan RA, Haque SF, 2008: Effect of *Nigella sativa* oil on various clinical and biochemical parameters of insulin resistance syndrome. *Int J Diabetes Dev Ctries*, 28 (1), 11-14.
- Negi N, Mokta J, Sharma B, Sharma R, Jhobta A, Bodh V, Ranjan A, 2018: Clinical Profile and Outcome of Acute Pancreatitis: A Hospital-Based Prospective Observational Study in Subhimalayan State. *J Assoc Phys India*, 66, 22-24.
- Okura Y, Hayashi K, Shingu T, Kajiyama G, Nakashima Y, Saku K, 2004: Diagnostic evaluation of acute pancreatitis in two patients with hypertriglyceridemia. *World J Gastroenterol: WJG*, 10 (24), 3691.
- Pădureanu V, Florescu DN, Pădureanu R, Ghenea AE, Gheonea DI, Oancea CN, 2022: Role of antioxidants and oxidative stress in the evolution of acute pancreatitis (Review). *Exp Ther Med*, 23. doi: 10.3892/etm.2022.11120.
- Pakala R, Stabile E, Jang GJ, Clavijo L, Waksman R, 2005: Rapamycin attenuates atherosclerotic plaque progression in apolipoprotein E knockout mice: inhibitory effect on monocyte chemotaxis. *J Cardiovasc Pharmacol*, 46 (4), 481-486.
- Patel K, Trivedi RN, Durgampudi C, Noel P, Cline RA, DeLany JP, Navina S, Singh VP, 2015: Lipolysis of visceral adipocyte triglyceride by pancreatic lipases converts mild acute pancreatitis to severe pancreatitis independent of necrosis and inflammation. *Am J Pathol*, 185 (3), 808-819.
- Peng YS, Chen YC, Tian YC, Yang CW, Lien JM, Fang JT, Wu CS, Hung CF, Hwang TL, Tsai YH, 2015: Serum levels of apolipoprotein AI and high-density lipoprotein can predict organ failure in acute pancreatitis. *Crit Care*, 19 (1), 1-9.
- Qidwai W, Ashfaq T, 2014: Effect of dietary supplementation of black seed (*N. Sativa* L.) on lipid profile of patients suffering from diabetes. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*, 13 (1), 3-8. doi: 10.2174/18715230113129990020.
- Radad K, Moldzio R, Taha M, Rausch WD, 2009: Thymoquinone protects dopaminergic neurons against MPP+ and rotenone. *Phytother Res*, 23 (5), 696-700. doi: 10.1002/ptr.2708.
- Ragheb A, Elbarbry F, Prasad K, Mohamed A, Ahmed MS, Shoker A, 2008: Attenuation of the development of hypercholesterolemic atherosclerosis by thymoquinone. *Int J Angiol*, 17 (4), 186-192. doi: 10.1055/s-0031-1278307.
- Roberts SE, Morrison-Rees S, John A, Williams JG, Brown TH, Samuel DG, 2017: The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe. *Pancreatol*, 17 (2), 155-165.
- Sabzghabae AM, Dianatkah M, Sarrafzadegan N, Asgary S, Ghannadi A, 2012: Clinical evaluation of *Nigella sativa* seeds for the treatment of hyperlipidemia: a

- randomized, placebo controlled clinical trial. *Med Arch*, 66 (3), 198-200.
- Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Mehrad-Majd H, Mirhafez SR, 2015: Thymoquinone Ameliorates Acute Renal Failure in Gentamicin-Treated Adult Male Rats. *Pharmacology*, 96 (3-4), 112-117.
- Schmidt J, Lewandrowski K, Fernandez-del Castillo C, Mandavilli U, Compton C, Warshaw A, Rattner D, 1992: Histopathologic correlates of serum amylase activity in acute experimental pancreatitis. *Dig Dis Sci*, 37 (9), 1426-1433.
- Schoenberg MH, Birk D, Beger HG, 1995: Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis. *Am J Clin Nutr*, 62 (6 Suppl), 1306S-1314S. doi: 10.1093/ajcn/62.6.1306S.
- Shabana A, El-Menyar A, Asim M, Al-Azzeh H, Al Thani H, 2013: Cardiovascular benefits of black cumin (*Nigella sativa*). *Cardiovasc Toxicol*, 13 (1), 9-21.
- Song R, Yu D, Park J, 2016: Changes in gene expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 in a canine model of caerulein-induced pancreatitis. *Can J Vet Res*, 80 (3), 236-241.
- Sweiry JH, Mann GE, 1996: Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*, 219, 10-15.
- Tvarijonaviciute A, García-Martínez JD, Caldin M, Martínez-Subiela S, Tecles F, Pastor J, Ceron JJ, 2015: Serum paraoxonase 1 (PON1) activity in acute pancreatitis of dogs. *J Small Anim Pract*, 56 (1), 67-71. doi: 10.1111/jsap.12297.
- Unal E, Uzun H, Kusan R, Dogan M, Genc H, Gunes P, Titiz I, 2005: Serum paraoxonase (a high-density lipoprotein-associated lipophilic antioxidant) activity and lipid profile in experimental acute pancreatitis. *Pancreas*, 31 (1), 84-87.
- Van Dijk SM, Hallensleben NDL, van Santvoort HC, Fockens P, van Goor H, Bruno MJ, Besselink MG, ; Dutch Pancreatitis Study Group, 2017: Acute pancreatitis: recent advances through randomised trials. *Gut*, 66 (11), 2024-2032. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313595.
- Vardar D, Mollahaliloğlu S, Öztaş D, 2018: Examining the effects of phytochemicals used in phytotherapy on public health. *J Health Sci Med*, 1 (4), 99-105.
- Velusamy RK, Tamizhselvi R, 2018: Protective effect of methylsulfonylmethane in caerulein-induced acute pancreatitis and associated lung injury in mice. *J Pharm Pharmacol*, 70 (9), 1188-1199. doi: 10.1111/jphp.12946.
- Wan J, He W, Zhu Y, Zhu Y, Zeng H, Liu P, Xia L, Lu N, 2017: Stratified analysis and clinical significance of elevated serum triglyceride levels in early acute pancreatitis: a retrospective study. *Lipids Health Dis*, 16 (1), 1-7.
- Wang YJ, Sun JB, Li F, Zhang SW, 2006: Hyperlipidemia intensifies cerulein-induced acute pancreatitis associated with activation of protein kinase C in rats. *World J Gastroenterol: WJG*, 12 (18), 2908-2913.
- Wang Y, Sternfeld L, Yang F, Rodriguez JA, Ross C, Hayden MR, Carriere F, Liu G, Hofer W, Schulz I, 2009: Enhanced susceptibility to pancreatitis in severe hypertriglyceridaemic lipoprotein lipase-deficient mice and agonist-like function of pancreatic lipase in pancreatic cells. *Gut*, 58 (3), 422-430.
- Weidner G, Connor SL, Chesney MA, Burns JW, Connor WE, Matarazzo JD, Mendell NR, 1991: Sex differences in high density lipoprotein cholesterol among low-level alcohol consumers. *Circulation*, 83 (1), 176-180.
- Werlang ME, Lewis MD, Bartel MJ, 2017: Tumor Necrosis Factor Alpha Inhibitor-Induced Acute Pancreatitis. *ACG Case Rep J*, 4 (1), e103. doi: 10.14309/crj.2017.103.
- Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KHB, 2012: Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem Pharmacol*, 83 (4), 443-451.
- Zaoui A, Cherrah Y, Alaoui K, Mahassine N, Amarouch H, Hassar M, 2002: Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *J Ethnopharmacol*, 79 (1), 23-26.
- Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A, 2009: Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res*, 50 (1), 3-21.
- Zhang X, Zhu C, Wu D, Jiang X, 2010: Possible role of toll-like receptor 4 in acute pancreatitis. *Pancreas*, 39 (6), 819-824.

\*Yazışma Adresi: Deniz ULUIŞIK

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye.

e-mail: denizfedai@selcuk.edu.tr



## Beyaz Peynir Örneklerinden *Staphylococcus aureus* Suşlarının İzolasyonu, Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) Direnç Fenotipleriyle, Metisilin ve Vankomisin Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Alper GÜNGÖREN<sup>1,a</sup>, Ayşegül DEMİRCİOĞLU<sup>2,b,\*</sup>, Ahmet Murat SAYTEKİN<sup>3,c</sup>

<sup>1</sup>Bingöl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Bingöl, Türkiye.

<sup>2</sup>Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Görükle Kampüsü, Bursa, Türkiye.

<sup>3</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0001-7818-1372, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-5121-2631, <sup>c</sup>ORCID: 0000-0001-7486-8054

Geliş Tarihi: 08.02.2022

Kabul Tarihi: 29.04.2022

**Özet:** Geleneksel olarak halk elinde üretilen peynirlerde çok sayıda patojen mikroorganizma (örn., *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*) bulunabilmektedir. Bu durum, çiğ süt kalite standardının olmaması, üretim hijyeninin yetersizliği, peynirin olgunlaşmadan tüketime sunulması gibi nedenlerden kaynaklanmakta ve halk sağlığını tehdit eden bir unsur olarak karşımıza çıkabilmektedir. *S. aureus*, gıda zehirlenmesi vakalarında *Salmonella spp.*'den sonra en yaygın görülen patojen olarak kabul edilmektedir. *S. aureus*'un gıdalara kontaminasyonunda en önemli rezervuarı insan ve hayvanların oluşturduğu bilinmektedir. Bu çalışmada analizi yapılmak üzere ambalajsız olarak satılan ve kontaminasyona açık 64 adet salamura beyaz peynir numunesi kullanılmıştır. Analize alınan numunelerden 24'ünde koagülaz pozitif stafilokok tespit edilmiştir. Pozitif numunelerden spesifik 5 koloni seçilerek toplamda 120 izolata API 20 Staph kit sistemi uygulanmış ve bu izolatlardan 52'si *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. Elde edilen *S. aureus* izolatlarına Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) yönergeleri doğrultusunda antibiyogram testleri yapılmıştır. Araştırma sonucunda tanımlanan izolatların hiçbiri vankomisine dirençli (VRSA) değilken, 6'sının (%11.5) metisiline dirençli (MRSA), 46'sının ise (%88.5) metisiline duyarlı (MSSA) olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen MRSA suşlarından 4'ü (%67) eritromisine, 3'ü (%50) klindamisine dirençli iken, MSSA suşlarının 17'si (%37) eritromisine, 7'si (%15,2) klindamisine direnç göstermiştir. Metisilin direnci olsun ya da olmasın tüm izolatların (%40,4) 21'i Eritromisin direnci göstermiştir. Bunların dışında tüm izolatların (%19,2) 10'u hem Eritromisin hem de Klindamisin direnci göstermiş ve (%13,5) 7'sinde induklenebilir Klindamisin direnci tespit edilmiştir. Sonuç olarak semt pazarlarında ambalajsız olarak satışa sunulan salamura peynirlerde halk sağlığı için problem oluşturan çoklu antibiyotik dirençliliği gösteren *S. aureus* suşları tespit edilmiştir. Bunu önlemek amacıyla uygulanan hijyen ve sanitasyon kurallarına dikkat edilmesi, kontrolsüz ve denetimsiz satışların önlenmesi gerektiği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik dirençliliği, MRSA, Peynir, *S. aureus*,

### Isolation of *Staphylococcus aureus* Strains from White Cheese Samples, Determination of Methicillin and Vancomycin Susceptibility with Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) Resistance Phenotypes

**Abstract:** Many pathogenic microorganisms (e.g., *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*) can be found in traditionally produced cheeses. This situation arises from the lack of raw milk quality standards, insufficient production hygiene, and the consumption of cheese before it is ripe, and it can pose a threat to public health. *S. aureus* is considered the most common causative agent of food poisoning after *Salmonella spp.* It is well known that humans and animals are the primary reservoirs for *S. aureus* contamination of food. This study examined 64 samples of salted white cheese sold unpackaged and open to contamination. Coagulase-positive staphylococci were detected in 24 of the samples tested. The API 20 Staph kit system was applied to 120 isolates by selecting five specific colonies from the positive samples, and 52 of these isolates were identified as *S. aureus*. We performed antibiogram tests on the recovered *S. aureus* isolates according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. While none of the identified isolates was vancomycin-resistant (VRSA), we found 6 (11.5%) were methicillin-resistant (MRSA), and 46 (88.5%) were methicillin-sensitive (MSSA). While 4 (67%) of the isolated MRSA strains were resistant to erythromycin and 3 (50%) to clindamycin, 17 (37%) of the MSSA strains were resistant to erythromycin, and 7 (15.2%) to clindamycin. With or without methicillin resistance, 21 of all isolates (40.4%) showed resistance to erythromycin. In addition, 10 (19.2%) of all isolates showed both erythromycin and clindamycin resistance and 7 (13.5%) showed inducible clindamycin resistance. As a result, strains of *S. aureus* resistant to several antibiotics have been found in cured cheese sold unpackaged in neighborhood markets, posing a public health problem. It is necessary to pay attention to the hygiene and sanitary regulations applied to prevent this and to stop uncontrolled and unsupervised sales.

**Keywords:** Antibiotic resistance, Cheese, MRSA, *S. aureus*,

## Giriş

Peynir, rennin enzimi ile sütün pıhtılaştırılmasından sonra peynir suyunun ayrılması, pıhtının şekillendirilmesi ve tuzlanmasıyla elde edilen, taze veya olgunlaştırılarak tüketilen bir süt ürünüdür. Beyaz peynir ise sütün pıhtılaştırılması, tekniğine uygun olarak işlenmesi ve işleme aşamalarına bağlı olarak taze veya olgunlaştırılmış tüketilebilen salamuralı peynir çeşididir (Hayaloğlu ve ark., 2002; TKG, 2015). Peynirler, zengin besin içerikleri, su aktivitesi ve pH değerleri nedeniyle mikroorganizmaların gelişmesi için iyi bir ortam oluştururlar (Aguilar ve ark., 2016). Endüstriyel uygulamalardan uzak halk elinde üretilen peynirlerde mikrobiyal kontaminasyon önem arz etmektedir. Hammaddeden son ürüne kadarki birçok aşamada (örn., mikrobiyal kalitesi düşük çiğ sütlerin kullanılması, kontamine alet ve ekipmanlar, yetersiz işletme hijyeni, personel kaynaklı kontaminasyonlar) peynire *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)'un bulaş riskini arttıran unsurlar bulunmaktadır (Erkmen, 2010; Kamber, 2005). Buradan hareketle, peynirlerde bulunabilecek *S. aureus* etkenlerinin farklı kaynakları olabileceği ifade edilebilmektedir. *S. aureus*, kökenini çoğunlukla sıcakkanlı hayvanların ve insanların burun ve boğaz mukozası ile derisinden alır. Gıda kaynaklı hastalıkların yanı sıra hastane enfeksiyonlarının da başlıca nedeni olarak gösterilir. Etken, insanlarda deri enfeksiyonları, bakteriyemi, sistemik hastalıklar, osteomyelit, toksik şok sendromu ve gıda zehirlenmesi gibi hayatı tehdit eden çoğunluğu gıda kaynaklı geniş bir enfeksiyon yelpazesine sahip önemli bir patojendir (Erkmen, 2010; Erol, 2007; Rahi, 2020).

Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar ve mikroorganizmalarda son dönemde sıklıkla gözlemlenen antimikrobiyal dirençlilik artışı halk sağlığı için endişe kaynağı olmaktadır. Bu durumun temel nedeni, antibiyotiklerin beşerî ve veteriner sahada kontrolsüz ve bilinçsiz kullanımı ile ilişkilendirilebilmektedir (Resende ve ark., 2018). Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonları küresel bir sağlık sorunudur. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonları hem hastane kaynaklı hem de toplumsal kaynaklı olabilir. Son yıllarda toplumsal kaynaklı MRSA enfeksiyonlarının insidensi özellikle sanayileşmiş ülkelerde artış göstermektedir (Normanno ve ark., 2007). Metisiline dirençli *S. aureus* suşlarının varlığı ilk defa 1960'lı yıllarda bildirilmiştir. 1980'li yıllara kadar MRSA enfeksiyonları hastaneler ve öncelikli olarak da immün sistemi baskılanmış bireyler ile sınırlı olmuştur. Ancak 1980'lerin sonu ve 1990'ların başından itibaren MRSA, dünya çapında halk sağlığını tehdit eden önemli bir enfeksiyon ajanı olarak tanınmıştır (Basanisi ve ark., 2017; Dougeraki ve

ark., 2016). MRSA'lar, penisilinlere, sefalosporinlere ve diğer  $\beta$ -laktam antibiyotiklere dirençli olmalarının yanında, makrolidler, kloramfenikol, klindamisin ve aminoglikozitlere de dirençli olabilirler (Bannerman, 2003; Koneman ve ark., 1997). Glikopeptid preparatları (vankomisin, teikoplanin) bu türde enfeksiyonlara karşı sıkça kullanılmaktadır (Ziyade ve ark., 2015). Veteriner hekimlikte de sağaltım amacıyla eritromisin, klindamisin ve spiramisin dahil makrolid-linkozamid-streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) antibiyotikleri sıklıkla kullanılmaktadır (Li ve ark., 2015). MLS<sub>B</sub> grubu antibiyotikler *Staphylococcus* türlerinde protein sentezini inhibe ederek etkisini gösterirler. Bu grupta kullanılan ilaçların tümü, bakterilerdeki 50S ribozomunun 23S alt birimine bağlandıkları için burada oluşan bir mutasyon üç farklı antibiyotiğe dirençle kendini gösterebilir (Ziyade ve ark., 2015). *S. aureus*'un gösterdiği MLS<sub>B</sub> direnci; efluks, enzimle inaktivasyon ve ilaç hedefinin değişikliğe uğraması şeklinde meydana gelir. Dirençli suşlarda en yaygın direnç tipi eritromycin ribosome methylation (erm) olarak adlandırılan genlerin kodladığı bir metilaz enzimi ile antibiyotiğin ribozoma bağlanmasının engellenmesidir (Wang ve ark., 2008). Direnç genlerinin kodladığı metilaz enziminin sentezi yapısal veya indüklenebilen türde olabilir. Yapısal formda *S. aureus* fenotipik olarak MLS<sub>B</sub>'ye dirençlidir. İndüklenebilen formda ise 14 üyeli makrolidlere direnç gelişirken 16 üyeli olanlarda duyarlılık gösterir. Bu sırada bakteri 16 üyeli makrolid, linkozamid ve streptograminlerle karşılaştığında direnç geliştirebilir. Bu tip indüklenebilir direnci ortaya çıkartmanın pratik bir yolu ise D-zone testinin yapılmasıdır (Leclercq., 2002). Gıda aracılığıyla bulaşan *S. aureus*'un, antibiyotik direncinin artmasıyla yakından ilişkili olduğu ve dirençli bakterileri içeren gıdaların, direnç genlerinin obligatif bir rezervuarı olarak gösterildiği bilinmektedir (Dehkordi ve ark., 2017; Rahi ve ark., 2020). Literatürde klinik izolatların MLS<sub>B</sub> direnç fenotipinin ve çoklu antibiyotik direncinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır (Çiçek ve ark., 2017; Khashei ve ark., 2018; Ziyade ve ark., 2015;). Gıda izolatlarında ise *S. aureus*'un çoklu antibiyotik direnci hakkında araştırmalar bulunsa da MLS<sub>B</sub> direnç fenotipine ve indüklenebilir klindamisin direncine yeteri kadar değinilmediği gözlemlenmiştir. İndüklenebilir tipte direncin ortaya çıkma ihtimali, dirençli bakterileri içeren gıdaların direnç genlerinin rezervuarı olarak gösterilmesi ve MRSA suşlarının yüksek virülensi, konunun önemini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada peynirlerden izole edilen *S. aureus* suşları ile metisilin ve vankomisin duyarlılığının yanı sıra MLS<sub>B</sub> direnç profilinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Etik Kurul:** Araştırmada materyal olarak halk pazarında satışa sunulan beyaz peynir numuneleri kullanıldığı için etik kurul izin belgesine gerek yoktur.

**Örneklerin toplanması ve analize alınması:** Araştırma kapsamında Bingöl halk pazarında ambalajsız ve dilimlenmiş olarak satılan beyaz peynir numuneleri kullanıldı. Numuneler (64 adet) Şubat-Haziran 2021 tarihleri arasında toplandı. Toplanan numuneler soğuk zincir altında laboratuvara getirilerek kısa sürede analizlere tabi tutuldu. Aseptik koşullarda steril pens ve makas yardımıyla 25 g tartılan peynir örnekleri, içerisinde 225 ml steril %0,1 Pepton water (Merck, Darmstadt, Germany) bulunan stomacher poşeti içerisine konularak stomacher cihazı (Lab321-LBST4) yardımıyla 2 dk boyunca homojenize edildi. Elde edilen  $10^{-1}$ lik dilüsyondan seri desimal dilüsyonlar yapılarak mikrobiyolojik analizler gerçekleştirildi.

**S. aureus suşlarının izolasyonu:** İzolasyon amacıyla içerisine egg yolk tellurite emulsiyon (Oxoid, SR 0054) ilave edilmiş Baird-Parker Agar (BPA) (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) besiyeri kullanıldı. Aerobik şartlarda 37 °C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra, BPA 'da gri siyah renkli ve berrak zonlu görüntü veren spesifik koloniler şüpheli koagulaz pozitif stafilocok olarak değerlendirildi. Daha sonra, her peynir numunesi için 5 adet şüpheli koloni seçildi ve ileri analizlerin yapılması için Tryptic Soy Broth'a (TSB) (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) aktararak saflaştırıldı. Şüpheli izolatlar, %5 koyun kanlı agara (Merck, Darmstad, Germany) ve Nutrient Agara pasajlanarak koloni morfolojisi, gram boyama, katalaz, tüp koagulaz, lam koagulaz ve mannitol fermentasyon testleri yapılarak tanımlandı. *S. aureus* olarak tanımlanan izolatlar API 20 Staph identifikasyon test kiti (Biomerieux, France) ile doğrulandı (Hitchins 1998; FDA, 2022).

**İzolatların antibiyotik direnç profilinin belirlenmesi:** İzole edilen suşların antibiyotik duyarlılığı Müeller-Hinton Agar (Merck, Darmstad, Germany) besiyerinde disk difüzyon yöntemi kullanılarak Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M100-S27) yönergeleri doğrultusunda tespit edildi (CLSI, 2017). İzolatların MLS<sub>B</sub> direnç fenotipleri, eritromisin (15 µg) ve klindamisin (2 µg) kullanılarak D-Zone disk yaklaşırma yöntemi ile araştırıldı. Sonuçlar Tablo 1'e göre değerlendirildi. İzolatların metisiline duyarlılığı sefoksitin (30 ug, Becton-Dickinson) diski kullanılarak, vankomisin duyarlılığı ise sıvı makro dilüsyon yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla 18-24 saatlik genç kültürler 2, 4, 8 ve 16 µg/mL vankomisin içeren ve kontrol grubu olarak vankomisin içermeyen Müeller-Hinton broth (Merck, Darmstad, Germany) tüplerine geçildi. Tüpler 37°C'de 24-48 saat aerobik

koşullarda inkübe edildi. Negatif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşu, pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 suşu kullanıldı. Gözle görülür bulanıklığın olmadığı ilk

**Tablo 1.** MLS<sub>B</sub> Direnç fenotipinin saptanması.

	Eritromisin	Klindamisin
<b>Yapısal</b>	Dirençli (R)	Dirençli (R)
<b>İndüklenebilir</b>	D--zonu pozitif	Duyarlı (S)
<b>M tipi</b>	D--zonu egatif	Duyarlı (S)
<b>Duyarlı</b>	Duyarlı (S)	Duyarlı (S)

konsantrasyon, genel besiyerine geçilerek üreme durumuna göre minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak kaydedildi (Ziyade ve ark., 2015). Sonuçlar CLSI (2017) yönergelerinde belirtildiği üzere ≤ 2 µg/ml-duyarlı, 4-8 µg/ml-orta duyarlı, ≥16 µg/ml-dirençli olarak yorumlandı.

## Bulgular

Araştırma kapsamında analize alınan peynir numunelerinin 24'ünden (%37,5) *S. aureus* izole ve identifiye edildi. BPA'da elde edilen toplam 120 koagulaz pozitif stafilocok izolatının 52'si, *S. aureus* olarak tanımlandı. Tanımlanan bu izolatlarda vankomisine direnç (VRSA) tespit edilmedi. İzolatların %11,5'inin (6/52) metisiline dirençli (MRSA), %88,5'inin (46/52) ise metisiline duyarlı (MSSA) olduğu tespit edildi (Tablo 2).

**Tablo 2.** *S. aureus* suşlarının metisilin ve vankomisin direnç/duyarlılık dağılımı.

	MRSA	MSSA	VRSA	VSSA
<b>N</b>	6/52	46/52	0/52	52/52
<b>%</b>	%11,5	%88,5	%0	%100

Araştırmada izole edilen MRSA suşlarından %67'si (4/6) eritromisine, %50'si (3/6) klindamisine dirençli iken, MSSA suşlarının %37'si (17/46) eritromisine, %15,2'si (7/46) ise klindamisine direnç gösterdi. Metisilin direnci olsun ya da olmasın tüm izolatların %40,4'ü (21/52) eritromisine direnç gösterdi. Bunların dışında tüm izolatların %19,2'sinde (10/52) hem eritromisin hem de klindamisin direnci tespit edildi.

*S. aureus* suşlarının MLS<sub>B</sub> direnç fenotipi dağılımı Tablo 3' de belirtilmiştir. Buna göre MRSA suşlarının %16,7'sinde (1/6) ve MSSA suşlarının %15,3'ünde (6/46) indüklenebilir (D zonu pozitif) tipte direnç saptandı. Ayrıca, MRSA suşlarının hiçbirinde, M tipi (D zonu negatif) direnç

saptanmazken, sadece MSSA suşlarında %8.7 (4/46) oranında M tipinde direnç gözlemlendi. Ek olarak, MRSA

**Tablo 3.** *S. aureus* suşlarında MLS<sub>B</sub> direnç fenotiplerinin dağılımı

Direnç Fenotipi	MRSA		MSSA		Toplam	
	N	%	N	%	N	%
Yapısal	3	50	7	15.3	10	19,2
İndüklenebilir	1	16.7	6	13	7	13,5
M tipi	-	0	4	8,7	4	7,7
Duyarlı	2	33.3	29	63	31	59,6
			<b>Toplam</b>		52	100

izolatlarının %33.3'ü (2/6), MLS<sub>B</sub> grubu antibiyotiklere duyarlı iken, MSSA izolatlarının %63'ü (29/46), bu grup antibiyotiklere duyarlı bulundu.

## Tartışma ve Sonuç

*S. aureus* insanların deri ve burun mukozalarında yüksek oranlarda bulunmaktadır. Gıdalar sekonder kontaminasyonla bu etken ile kontamine olabilir. Ayrıca *S. aureus* bakterisi süt hayvanlarında mastitis oluşturan bir mikroorganizma olması nedeniyle, süt ve süt ürünlerinde yine yaygın olarak görülebilmektedir (Dehkordi, 2017; Erkmen, 2010). Bu çalışmada ambalajsız ve dilimlenmiş olarak satılan beyaz peynir numunelerinin %37.5'inin (24/64), *S. aureus* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Kayılı ve Şanlıbaba (2020), Türkiye'nin farklı illerinden topladığı toplam 384 adet beyaz peynir için *S. aureus* izolasyon oranını %22,14 olarak bildirmiştir. Gücükoğlu ve ark. (2012), beyaz peynir örneklerinde %37.5, kaşar peyniri numunelerinde %30 oranında *S. aureus* izole etmiştir. Yücel ve Anıl (2011), 90 peynir örneğinin 16'sında (%20.2) *S. aureus* izole etmişlerdir. Prabakusuma ve ark. (2022), Çin Rubing ve Rushan peynirlerini klasik kültürel yöntemle *S. aureus* varlığı bakımından değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar *S. aureus* izolasyon oranlarının sırasıyla %29.03 ve %8.06 olduğunu ifade etmişlerdir. Can ve ark. (2017), 160 gıda örneğinde yaptıkları bir çalışmada örneklerin %12.5'inde *S. aureus* varlığını bildirmişlerdir. Bu çalışma ve yapılan diğer çalışmaların sonuçları incelendiğinde *S. aureus*'ün tespit oranlarının çoğunlukla birbirinden farklı olduğu görülmektedir. Bu durum, araştırmacıların da (Cai ve ark., 2021; Tekinşen ve Özdemir, 2006) belirttiği gibi mikrobiyal yükü fazla olan sütlerin peynire dönüştürülmesi, üretimde çiğ sütün tercih edilmesi, kullanılan starter

kültür aktivitesinin yetersiz olması, sütün pastörizasyon sonrası kontaminasyonu ile ürünün işlenmesi ve muhafazası sırasındaki uygun olmayan şartlardan kaynaklanmış olabileceğini göstermektedir.

Gıda kaynaklı *S. aureus* suşları genellikle çeşitli antibiyotik tiplerine dirençlidir (Dehkordi ve ark., 2017). Stafilokok enfeksiyonlarının sağaltımında en önemli problem, penisilin bağlayan proteinlerdeki değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkan metisilin direncidir. Metisilin direnci, *mecA* geni tarafından kodlanan penisilin bağlayan proteinin 2a/2 (PBP2a/PBP2) üretimi sonucu ortaya çıkmaktadır (Özel ve ark., 2011). Hayvansal ve beşeri kaynaklı MRSA suşlarının, direnç potansiyeli yüksek yeni suşların ortaya çıkmasında önemli bir rezervuar olduğu düşünülmektedir (Dehkordi ve ark., 2017). MRSA suşlarının gıdalarda bulunması, etkenin halk sağlığı bakımından önem arz ettiğini göstermektedir. Bu çalışmada, izole edilen 52 adet *S. aureus* izolatının %11.5'inde (6/52) metisilin direnci tespit edildi. Yücel ve Anıl, 2011, 90 peynir örneğinden elde edilen 79 koagülaz pozitif izolatın 9'unda (%11.3), fenotipik olarak metisilin direnci saptamışlardır. Özpinar (2011), 100 adet tulum peyniri numunesinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının %14.7'sinde oksasilin ve metisilin dirençliliğini bildirmiştir. Urfa peynirlerinde yapılan bir başka çalışmada, %31.25 oranında MRSA tespit edilmiştir (Bingöl ve Toğay, 2017). Papadopoulos ve ark. (2018) birbirinden farklı numune türlerinden 367 örneğin 212'sinden (%57.8) *S. aureus* izole etmiş ve *S. aureus* izolatlarının 21'ini (%3,8) antimikrobiyal dirençlerine göre olası MRSA olarak tanımlamışlardır. MRSA; polistiren, paslanmaz çelik, cam, seramik ve diğer gıda sektöründe yaygın olarak kullanılan farklı yüzeylere yapışabilir ve biyofilm oluşturabilir (Rodríguez-Lázaro ve ark., 2018). Bu durum halk sağlığı için endişe kaynağı oluşturmakta ve üretimde hijyenin önemini ortaya koymaktadır.

Vankomisin, metisiline dirençli ve duyarlı *S. aureus* suşlarında son çare olarak kullanılır ve bu sebeple *S. aureus* bu antibiyotige karşı yaygın bir direnç gösterememiştir. Fakat nadiren de olsa, vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) suşları görülmekte ve izole edilmektedir. Spanu ve ark. (2014), çiğ koyun sütünden elde edilmiş peynirlerde yaptıkları bir çalışmada 150 *S. aureus* izolatının hiç birinde vankomisin direncini tespit edemediğini bildirmiştir. Can ve Çelik (2012), 200 peynir örneğinden izole edilen 19 koagülaz pozitif stafilokok suşunun vankomisin, gentamisin ve imipenem'e duyarlı olduğunu bildirmiştir. Benzer amaçla yürütülen çalışma bulgularına benzer şekilde bu çalışmada izole edilen *S. aureus* suşlarının hiç birinde vankomisin dirençliliği tespit edilmemiştir.

Süt ve süt ürünlerinde çok sayıda antibiyotiğe dirençli *S. aureus* suşlarının varlığı birçok araştırmada belirtilmiştir (Papadopoulos ve ark., 2018; Cai ve ark., 2021; Prabakusuma ve ark., 2022). Bu çalışmada izolatların %40.4'ü (21/52) eritromisine, %19,2'si ise (10/52) hem eritromisin hem de klindamisine dirençli bulunmuştur. Ayrıca izole edilen suşların %6'sı (3/52) metisilin, eritromisin ve klindamisin'e çoklu direnç göstermiştir. Buna göre MRSA suşlarından yapısal dirence sahip olanların oranı %50 (3/6) bulunmuştur. Tüm MRSA suşlarından %16.7'si (1/6) indüklenebilir klindamisin direnci göstermiştir. Metisilin direncinin olmadığı suşlardan 15,3'ü (7/46) yapısal tipte eritromisin ve klindamisine direnç göstermiştir. Aynı zamanda bu suşlardan %13'ü (6/46) indüklenebilir klindamisin direnci göstermiştir. Cai ve ark. (2021), kazak peynirlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının %27.4'ünde (17/62) eritromisin direnci, %22.6'sında (14/62) klindamisin direnci tespit etmiş, aynı zamanda %27.4 (17/62) oranında 3 veya daha fazla antibiyotik direnci belirlemişlerdir. Normano ve ark. (2007), süt ve süt ürünlerinden izole ettikleri 6 MRSA'dan hiç birinde eritromisin ve klindamisin direnci tespit etmemişlerdir. Prabakusuma ve ark. (2022), Rubing ve Rushan peynirinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının %34.8'inde (8/23) eritromisin direnci, %21.7'sinde (5/23) klindamisin direnci tespit etmişlerdir. Bununla birlikte %17.4'ünde (4/23) hem eritromisin hem de klindamisin direnci tespit edildiğini bildirmişlerdir. Yapılan literatür taramaları ve bu araştırma farklı oranlarda çoklu antibiyotik direnci gösteren *S. aureus*'ün süt ve süt ürünlerinde bulunabileceğini göstermektedir. Bunlara ek olarak indüklenebilir klindamisin direnci *S. aureus* enfeksiyonlarında hem veteriner hem de beşeri hekimlikte tedavi için önemlidir (Li longping ve ark., 2015; Ziyade ve ark., 2015). Bu araştırma indüklenebilir klindamisin direnci olan *S. aureus* suşlarının peynir numunelerinde mevcut olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak hızla artan dünya nüfusuyla paralel biçimde gıda kaynaklı antibiyotik dirençliliğinin nüfusun büyük çoğunluğunu etkiliyor olması, üretim ve satış aşamalarında olası tehlikelere maruziyetin engellenmesi veya minimuma indirilmesi amacıyla alınacak tedbirlerin önemini artırmaktadır. Yapılan çalışmada halk pazarlarında satışa sunulan peynirlerde çoklu antibiyotik dirençliliği olan *S. aureus* suşları tespit edilmiştir. Peynirlerde MRSA prevalansını düşürmek ve önlemek adına, üretimde kullanılacak sütlerin sağlıklı hayvanlardan temin edilmesi, sağımdan üretim prosesinin son aşamasına kadar belirlenen hijyen kurallarına uyulması gerekmektedir. Bunların yanında, açıkta, denetimsiz ve kontrolsüz bir şekilde

yapılan peynir satışının engellenmesi gerektiği düşünülmektedir.

### Çıkar çatışması

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

### Etik izin

Bu çalışma için etik kurul iznine gerek olmağı, ayrıca yazarlar Araştırma ve Yayın Etiğine uyduğunu beyan etmişlerdir.

### Benzerlik Oranı

Makalenin benzerlik oranının sisteme yüklenen raporda belirttiği gibi % 15 olduğunu beyan ederiz.

### Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: AG  
Tasarım: AD, AG  
Denetleme/Danışmanlık: AMS  
Veri Toplama ve/veya İşleme: AD, AG  
Analiz ve/veya Yorum: AD, AG, AMS  
Kaynak Taraması: AD, AG  
Makalenin Yazımı: AD, AG, AMS  
Eleştirel İnceleme: AMS

### Kaynaklar

- Aguiar CEG, Rossi Junior OD, Vidal AMC, Ribeiro LF, Rossi GAM, 2016: Microbial quality of industrial and retail market grated parmesan cheese in the State of São Paulo, Brazil. *Cienc Rural*, 46 (12), 2257-2263.
- Anonim, 2015: Tebliğ, T.G.K. Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (No: 2015/6). Resmi gazete, (29261).
- Basanisi MG, La Bella G, Nobili G, Franconieri I, La Salandra G, 2017: Genotyping of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. *Food Microbiol*, 62, 141-146.
- Bannerman TL, 2003. *Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically*, In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover JC, Tenover FC (Ed), *Manual of Clinical Microbiology* Volume II, 8th, 384-403, Washington, DC.
- Bingöl KK, Toğay SÖ, 2017: Urfa peynirlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında enterotoksin üretim potansiyeli ve metisilin dirençliliği. *Akademik Gıda*, 15, 29-35.
- Can HY, Çelik TH, 2012: Detection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant *S. aureus* in Turkish cheeses. *Food Control*, 24, 100-103.
- CLSI, 2017: Clinical and laboratory standards institute. "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing." *CLSI supplement M100*.

- Can HY, Elmalı M, Karagöz A, 2017: Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk, cheese, minced meat, and chicken meat samples. *Korean J Food Sci Anim Resour*, 37, 175.
- Cai H, Kou X, Ji H, Wang X, Wang H, Zhang Y, Shili L, Baokun L, Juan D, Qingling W, Jing Z, Hu D, 2021: Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from Kazak cheese in Xinjiang, China. *Food Control*, 123, 107759.
- Çiçek M, Tuncer Ö, Sancak B, Şener B, 2017: *Staphylococcus aureus* suşlarında makrolid, linkozamid ve streptogramin b direncinin fenotipik yöntemlerle belirlenmesi ve kinupristin/dalfopristinin in vitro etkinliğinin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg*, 47 (2), 83-88.
- Doulgeraki AI, Di Ciccio P, Ianieri A, Nychas GJE, 2016: Methicillin-resistant food-related *Staphylococcus aureus*: a review of current knowledge and biofilm formation for future studies and applications. *Res Microbiol*, 168 (1), 1-15.
- Dehkordi FS, Gandomi H, Basti AA, Misaghi A, Rahimi E, 2017: Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospital food. *Antimicrob Resist Infect Control*, 6 (1), 1-11.
- Erkmen O, 2010: Gıda mikrobiyolojisi Efil Yayınevi, Ankara, Türkiye.
- Erol I, 2007: Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif matbaacılık, Ankara, Türkiye.
- FDA Bacteriological Analytical Manual, Chapter 12 *Staphylococcus aureus*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus> Erişim tarihi; 10.01.2022.
- Güçükoğlu A, Onur Kevenk T, Uyanık T, Çadirci Ö, Terzi G, Alişarlı M, 2012: Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk and dairy products by multiplex PCR. *J Food Sci*, 77 (11), 620-623.
- Hayaloglu AA, Guven M, Fox PF, 2002: Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese 'Beyaz Peynir'. *Int Dairy J*, 12, 635-648.
- Hitchins AD, 1998: in FDA Bacteriological Analytical Manual, G.J. Jackson (Ed.), AOAC International, Gaithersburg, MD, 1001-1013.
- Kamber U, 2005: Geleneksel Anadolu Peynirleri. Miki Matbaacılık San ve Tic Ltd Şti, Ankara.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WD, Schereckenberger PC, Winn WC, Jr, 1997: The Gram Positive Cocci: Part I Staphylococci and Related Organisms, In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th. ed, 539-576, Philadelphia.
- Khashei R, Malekzadegan Y, Ebrahim-Saraie HS, Razavi Z, 2018: Phenotypic and genotypic characterization of macrolide, lincosamide and streptogramin B resistance among clinical isolates of staphylococci in southwest of Iran. *BMC Res Notes*, 11 (1), 1-6.
- Kayili E, Sanlibaba P, 2020: Prevalence, characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional cheeses in Turkey. *Int J Food Prop*, 23 (1), 1441-1451.
- Li L, Feng W, Zhang Z, Xue H, Zhao X, 2015: Macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes and genotypes of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine mastitis. *BMC Vet Res*, 11 (1), 1-8.
- Leclercq R, 2002: Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Arch Clin Infect Dis*, 34 (4), 482-492.
- Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, Greco G, Bellacicco AL, Virgilio S, Celano GV, 2007: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *Int J Food Microbiol*, 117 (2), 219-222.
- Özel G, Aslan V, Bahar Erdem G, Çağatay M, Şencan İ, Mert A, 2011: Stafilokoklarda metisilin duyarlılığının belirlenmesinde oksasilin, sefoksitin, seftizoksim ve moksalaktam disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 45 (2), 258-65.
- Özpinar N, 2011: Erzincan tulum peynirinden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında antibiyotik direncinin ve biyofilm oluşturma özelliğinin fenotipik ve genotipik olarak belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Papadopoulos P, Papadopoulos T, Angelidis AS, Boukouvala E, Zdragas A, Papa A, Hadjichristodoulou C, Sergelidis D, 2018: Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. *Food Microbiol*, 69, 43-50.
- Rahi A, Kazemeini H, Jafariaskar, S, Seif A, Hosseini S, Dehkordi FS, 2020: Genotypic and phenotypic-based assessment of antibiotic resistance and profile of staphylococcal cassette chromosome mec in the methicillin-resistant staphylococcus aureus recovered from raw milk. *Infect Drug Resist*, 13, 273-283.
- Resende JA, Fontes CO, Ferreira-Machado AB, Nascimento TC, Silva VL, Diniz CG, 2018: Antimicrobial-resistance genetic markers in potentially pathogenic gram positive cocci isolated from brazilian soft cheese. *J Food Sci*, 83 (2), 377-385.
- Rodríguez-Lázaro D, Alonso-Calleja C, Oniciuc EA, Capita R, Gallego D, González-Machado C, Wagner M, Barbu V, Eiros-Bouza JM, Nicolau AI and Hernández M, 2018: Characterization of biofilms formed by foodborne methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*, 9, 1-12.
- Sri Prabakusuma A, Zhu J, Shi Y, Ma Q, Zhao Q, Yang Z, Xu Y, Huang A, 2022: Prevalence and antimicrobial resistance profiling of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional cheese in Yunnan, China. *3 Biotech*, 12 (1), 1-15.
- Spanu V, Scarano C, Cossu F, Pala C, Spanu C, De Santis EP, 2014: Antibiotic resistance traits and molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from raw sheep milk cheese. *J Food Sci*, 79 (10), 2066-2071.
- Tekinşen KK, Özdemir Z, 2006: Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van otlı (Herb) cheese. *Food Control*, 17, 707-711.

Wang Y, Wu CM, Lu LM, Ren GWN, Cao XY, Shen JZ, 2008: Macrolide–lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet Microbiol*, 130 (1-2), 118-125.

Yücel N, Anıl Y, 2011: Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from raw milk and cheese samples. *Turk bull hyg exp biol*, 68 (2), 73-78.

Ziyade N, Yağmur G, Elgörmüş N, Karayel F, Büyük Y, 2015: Postmortem örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin, vankomisin, teikoplanin ve makrolid-linkozamid-streptogramin b (MIs<sub>b</sub>) direnci. *Ankem Derg*, 29 (1), 1-7.

**\*Yazışma Adresi:** Ayşegül DEMİRCİOĞLU  
Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,  
Görükle Kampüsü, Bursa, Türkiye.  
**e-mail:** aysegulertekinn@hotmail.com

## Immunohistochemical Evaluation of Syndecan-1 Expression in the Liver of Small Ruminants with Natural Liver Fluke Infection

Nihat YUMUSAK<sup>1,a,\*</sup>, Kursat FILIKCI<sup>1,b</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Harran, Sanliurfa, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-9299-2902, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0001-9710-9480

Geliş Tarihi: 22.02.2022

Kabul Tarihi: 08.03.2022

**Abstract:** This study was conducted to investigate the pathomorphology of damage in liver tissues of ruminants infected with liver flukes and the role of syndecan-1 protein in this damage. In the study, liver tissue samples from 62 ruminants with liver parasites were used. Histopathological examination of these tissues was performed using hematoxylin-eosin staining. An immunohistochemical staining procedure was performed through the streptavidin-biotin-peroxidase (ABC) method to determine the syndecan-1 protein. Upon the macroscopic examination, congestion, hemorrhage, necrosis, and fibrosis were observed in infected livers. Hemorrhage, inflammation, degeneration, necrosis, and hyperplasia of the bile ducts were observed in severe liver sections upon microscopic examination. Syndecan-1 protein immunohistochemically exhibited a strong immunopositive reaction in infected liver tissues. This study concluded that the release of syndecan-1 protein increased liver damage induced by liver flukes.

**Keywords:** Immunohistochemistry, Liver, Small ruminant, Syndecan-1.

### Karaciğer Kelebekleriyle Doğal Enfekte Küçük Ruminant Karaciğerlerinde Sindekan-1 Salınımının İmmunohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

**Özet:** Bu çalışmada karaciğer kelebekleri ile enfekte olan ruminantlara ait karaciğer dokularında meydana gelen hasarın patomorfolojisi ve bu hasarda sindekan-1 proteininin rolü araştırıldı. Çalışmada karaciğer paraziti tespit edilen 62 ruminanta ait karaciğer doku örneği kullanıldı. Elde edilen dokularda histopatolojik inceleme amacıyla hematoksilen eosin boyaması yapıldı. Sindekan-1 proteininin belirlenmesi amacıyla streptavidin-biotin-peroksidaz (ABC) yöntemiyle immunohistokimyasal boyamalar yapıldı. Makroskopik incelemede enfekte karaciğerlerde konjesyon, kanama, nekroz ve fibrozis görüldü. Mikroskopik incelemede ise şiddetli karaciğer kesitlerinde kanama, inflamasyon, dejenerasyon, nekroz ve safra kanallarında hiperplazi gözlemlendi. İmmunohistokimyasal olarak enfekte karaciğer dokularında sindekan-1 proteininin şiddetli immunopozitif reaksiyon verdiği tespit edildi. Bu çalışma sonucunda karaciğer kelebeklerinin neden olduğu karaciğer hasarında sindekan-1 proteininin salınımının arttığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** İmmunohistokimya, Karaciğer, Küçük ruminant, Sindekan-1.

### Introduction

Liver fluke infections, also called fasciolosis or distomatosis, are parasitic zoonotic diseases prevalent in many species across the world. It produces significant economic losses since it causes weight loss, reduction in milk yield, susceptibility to bacterial illnesses, and especially morbidity and mortality in ruminants (Boray et al., 2017; Kaplan et al., 2001; Mas-Coma et al., 2009; Schweizer et al., 2005; Slifko et al., 2000). The disease is caused by the gastrointestinal trematodes *Fasciola* spp (*Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*) and *Dicrocoelium dendriticum* (*D. dendriticum*). Drinking water contaminated with the feces of infected animals or eating aquatic plants with parasitic metacercariae cause infection. Young parasites developing in the metacercariae in the intestines migrate through the peritoneum to the liver and bile ducts, where they mature. During migration,

these parasites in the liver and bile ducts cause significant hemorrhage, necrosis, and fibrosis in the liver (Dar et al., 2018; Khan et al., 2015; Mendes et al., 2012; Okoye et al., 2015; Talukder et al., 2010; Xia et al., 2015).

Syndecans are cell surface proteoglycans with a transmembrane domain, a C-terminal cytoplasmic intracellular domain, and an extracellular domain containing a core protein and bound to glycosaminoglycan (GAG) chains. Proteoglycans are located as hydrogels in the extracellular matrix (ECM) and enable the tissue to acquire mechanical strength (Roskams et al., 1996; Zvibel et al., 2009). These proteins are family members of four distinct genes (Syndecan 1, Syndecan 2, Syndecan 3, and Syndecan 4), each of which has different GAG chains and exhibits tissue-specific release. Syndecan 1 is a heparan sulfate proteoglycan (HSPG) released



primarily from the basolateral surface of liver cells and functions as a receptor of triacylglycerol-rich lipoproteins (TRLs) in the liver. It binds heparin sulfate in the extracellular structure and provides cell-cell and cell-matrix interaction as a cell surface protein. They have different functions, including co-receptor roles in chemokines and growth factors, and cellular migration and proliferation. Recent studies have reported that they have a role in liver cirrhosis, chronic cholestatic liver disease, bile duct proliferation, liver malfunction, and liver pathologies such as hepatocellular carcinoma (Hayashida et al., 2008; Matsumoto et al., 1997; Nam et al., 2017; Regos et al., 2020). This study aims investigate the role of the Syndecan-1 gene in liver damage induced by liver flukes, which are prevalent in ruminants.

## Material and Methods

**Sample Collection:** The liver tissues of 62 ruminants with liver fluke were used in this study. The tissue samples were fixed in neutral (Ph-7.0) formaldehyde for histopathological and immunohistochemical analyses. Healthy liver tissues from the slaughterhouse were used as the control group. All stages of the study were carried out with the approval of the national ethics committee and under the supervision of the local ethics commission (Approval No: 2022/001-01.11).

**Histopathological Analysis:** Tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin (pH 7.2–7.4) and taken for a routine pathology process. The tissue sections were passed through the xylol and alcohol series and stained with Hematoxylin and Eosin (HE). Samples were examined under a light microscope (Olympus DP-73, Olympus BX53–DIC microscope; Tokyo, Japan).

**Immunohistochemical Staining:** Formalin-fixed paraffin-embedded sections, performed on standard streptavidin biotin peroxidase complex (ABC) technique protocol (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA), after deparaffinization and rehydration procedures. The section was pre-treated using heat-mediated antigen retrieval with sodium citrate buffer (pH 6.0) for 20 mins. The sections were incubated with Syndecan-1 (DL-101, sc-12765, Santa Cruz, USA), diluted as 1:50 overnight at 4 °C. A goat anti-rabbit biotinylated secondary antibody was used to detect the primary antibody and visualized using an HRP conjugated ABC system. Diaminobenzidine (DAB, Dako/Denmark) was used as chromogen. Finally, the section was stained with hematoxylin for counterstain.

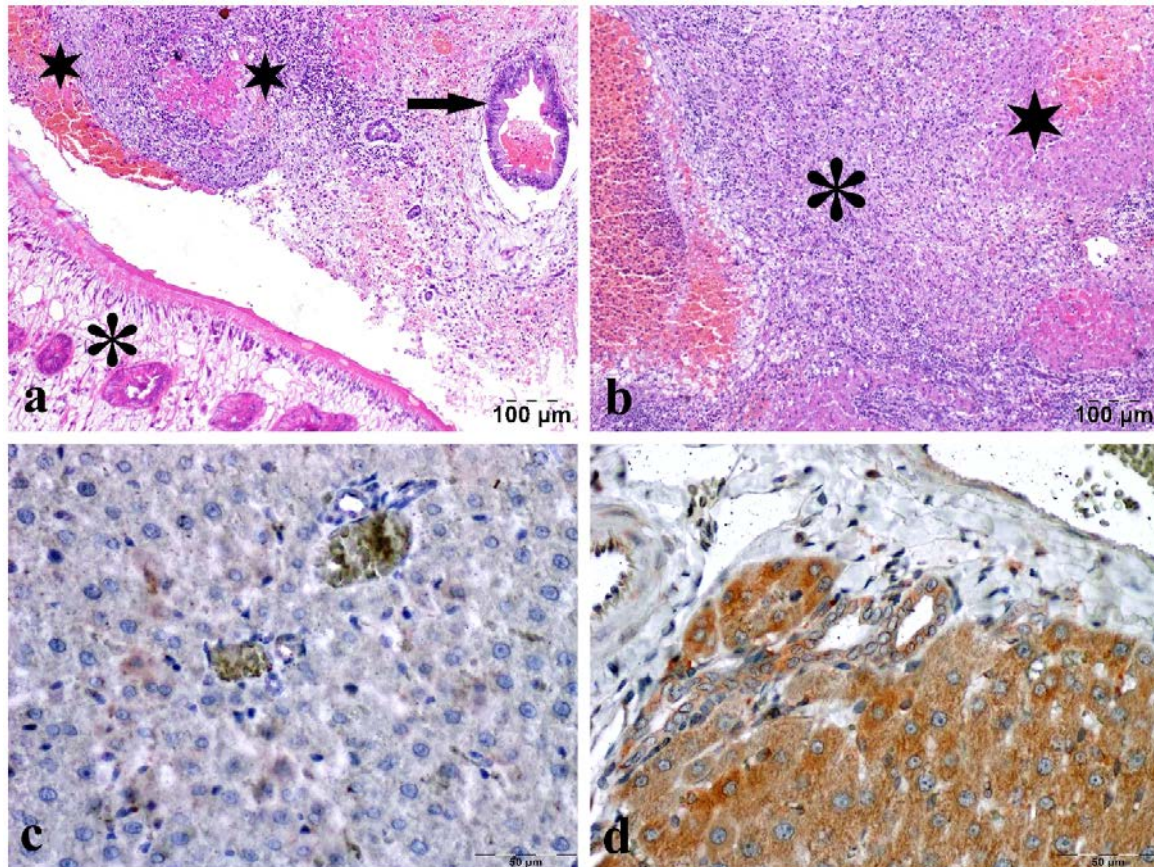
## Results

**Identification of Parasite Species:** The detected parasites' species were identified based on their morphological structures and adult or immature forms of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, and *D. dentriticum* defined.

**Macroscopic Findings:** In the necropsy of the cadavers brought with suspicion of endoparasite, yellow contents ranging from 100–400 ml were observed in their abdominal cavity. Fibrin particles were found on the liver and in the abdominal cavity in some cases. It was remarkable that livers with fasciolosis were larger than usual and congested. Their surfaces include large areas of pale necrotic foci. The parasite migration routes in the shape of strips were bleeding. Around these sites, oedema and severe hyperaemia were observed. Fibrosis was noteworthy in some areas. There were severe hemorrhagic regions and necrosis and fibrosis in the parenchyma on the section surface. In some hemorrhage regions, parasitic forms were observed. In all the cases, the fullness of the gall bladder has drawn attention. Bile was found to be viscous with a blackish color. The bile ducts were dilated, and some cases encountered parasitic forms were in the duct.

**Microscopic Findings:** It was remarkable that there were large hemorrhage regions in the liver tissues where parasites were detected. Inflammatory cell reactions involving many neutrophils, leukocytes, eosinophils, lymphocytes, and macrophages were observed around these hemorrhage sites. Additionally, multinucleated giant cells were identified among these cells. Hemosiderin pigment was detected in some macrophage cytoplasm. The remark cords were enlarged and filled with erythrocytes and had an irregular shape. Some hepatocyte cytoplasm locally had bile-colored pigments. In some hepatocytes, degenerative alterations were observed upon cytoplasmic vacuolization. Parasitic forms drew attention in some locations. However, it was pointed out that large areas of connective tissue were grown resulting from the destruction caused by the migration of the parasite in a significant part of the liver (Figure 1a, 1b).

It was immunohistochemically observed that syndecan-1 gave a mild cytoplasmic reaction in hepatocytes around the parasite migration routes with hemorrhage. Likewise, hepatocytes with degeneration and necrosis were slightly positive. Also, hepatocytes in areas where fibrosis was formed exhibited a more severe immune reaction. The staining had a granular structure and concentrated mainly at the sites close to the cell



**Figure 1.** a) Immature fluke (asterisk) producing hemorrhage and necrosis (stars) and irregular proliferation of bile ductuli (arrow). b) Fibrosis and inflammatory response (asterisk) producing necrosis (star), HE. c) In control liver tissue mild immunopositive cells, ABC, DAB chromogen. d) Severe positive reaction of syndecan-1 in infected liver, ABC, DAB chromogen.

membrane. On the other hand, liver tissues from healthy animals utilized as a control group showed a mild reaction (Figure 1c, 1d).

### Discussion and Conclusion

The studies on liver fluke parasites have revealed that they are common in many parts of the world, particularly in ruminants. The fight against this parasite results in significant economic losses (Schweizer et al., 2005; Slifko et al., 2000). These parasites, in particular, settle in the liver and cause mechanical and toxic damage to the organ, impairing vital functions. This liver damage causes the chemical mediators to release. These mediators result in the formation of inflammation and immune response. However, parasites that settle the liver migrate in the liver parenchyma and bile ducts and cause damage to the liver, including hemorrhage and necrosis (Dar et al., 2018; Khan et al., 2015; Talukder et al., 2010; Xia et al., 2015). The study by Dar et al. (2018) reported severe necrosis and fibrosis in liver tissues due to fasciolosis. In their study, Mendes et al. (2012) identified necrosis in acute hemorrhage and active granulomatous

sites. Rahko (1969) examined the parasite's early and late pathological damage in the liver tissue and concluded that it resulted in cirrhosis due to hemorrhage and macrophage proliferation in the early period. They determined in the same study that thrombosis occurred in the blood veins of the parasite migration routes. The study by Oyarzún-Ruiz et al. (2014) identified hyperplasia and hypertrophy in the bile ducts and inflammation in some bile ducts. In the same study, they detected fibrosis and granulomatous response in the liver parenchyma.. Al-Khafaji et al. (2020) detected hemorrhage cholangitis, and pericholangitis associated with fibrosis caused by adult parasite migration in the liver parenchyma. In their study on goats, Talukder et al. (2010) observed fatty alterations with atrophy in infected liver tissues. In their study on cattle, Okoye et al. (2015) identified degeneration in infected liver cell walls and deformation in the nucleus. Belina et al. (2015) reported that fat necrosis, multifocal necrosis, inflammation in the bile ducts, cholangitis, pyogranulation, and fibrosis and cirrhosis in the portal areas histopathologically formed in the liver tissues. These damages in the liver affected the body's biochemical values, resulting in systemic

infections. Deger et al. (2008) compared the oxidant/antioxidant values in the liver tissues of healthy and infected animals. In their study, they determined that the MDA concentration and GPx activity in the liver tissues of animals infected with liver flukes were much higher than those in the control group. However, in the infected group, the Cu, Zn-SOD, CAT activities, and GSH, vitamin C concentrations were significantly lower. The same study reported that ALT and AST serum activities were extremely high in the infected group in the blood biochemical evaluation. In their similar study, Kitila and Megersa (2014) biochemically determined that serum ALT, AST, and ALP values increased in parallel with the severity of pathological damage. The pathomorphology of liver tissues infected with live fluke was evaluated in this study. The findings of the study are compatible with previous studies. Pathological findings of acute inflammation and hemorrhage were observed, particularly in the early phase of infection. Fibrosis was prevalent in the late infection phase, along with the findings on chronic inflammation.

Syndecan-1 enables cell-cell and cell-matrix interactions by being released by many epithelial cells, particularly hepatocytes. These genes have been found in metabolic disorders such as infectious, fibrotic, and diabetes. Recent studies have reported that they have a role in liver pathologies, such as cirrhosis, infectious diseases, and different liver cancers (Roskams et al., 1996; Zvibel et al., 2009). Li et al. (2016) observed that syndecan-1 release increased in liver damage caused by ischemia-reperfusion in liver tissue in rats experimentally induced hepatic ischemia-reperfusion model. Matsumoto et al. (1997) investigated the release of syndecan-1 in the liver tissue of 57 HCC patients by immunohistochemistry and protein expression methods. Their study determined that the immunopositive reaction was histopathologically more severe in cases diagnosed with well-differentiated HCC than less differentiated HCC tissues. In the same study, they observed a widespread positive reaction in hepatocytes and bile duct epithelial cells in cases with HCC developing with hepatitis. Metwaly et al. (2012) determined that the serum syndecan-1 level elevated considerably in patients with cirrhosis, and this increase was positively correlated with ALT and AST values. Zvibel et al. (2009) determined that syndecan-1 levels were significantly higher, particularly in patients with hepatitis and cirrhosis than healthy individuals. Roskams et al. (1996) determined the presence of syndecan-1 positivity in chronic cholestatic liver disease. Regos et al. (2020) conducted a study on tissue samples taken from patients with various liver disorders and

determined that syndecan-1 was significantly immunopositive around hepatocytes and on proliferating bile duct surfaces in the cirrhotic liver. On the other hand, some researchers reported in their experimental studies that inflammatory response and tissue damage were more severe depending on the syndecan-1 deficiency. Hayashida et al. (2008) observed that in experimentally induced infectious toxic shock, mortality rates were higher in Sdc1<sup>-/-</sup> (syndecan-1-negative) rats than in normal rats and that liver tissue damage was severe along with vascular permeability. The same study reported that TNF-alpha and IL-6 significantly increased during the inflammatory response, and the inflammatory response got delayed. Nam et al. (2017) also determined that in Sdc1<sup>-/-</sup> rats with acetaminophen-induced liver damage, the mortality rate due to toxicity were higher, the serum ALT and AST levels elevated significantly, and histomorphologically, necrosis and apoptosis in the liver were more pronounced compared to normal rats. However, in the same study, they determined that treatment of syndecan-1 reduced serum ALT levels and histomorphological damage in these rats, and syndecan-1 had a role in liver tissue repair. The present study revealed that Syndecan-1 release was severe in fluke-induced liver damage, particularly in cases with late symptoms, fibrosis, and bile duct proliferation. Additionally, immunopositive reactions were found in the hepatocyte cytoplasm in areas with acute inflammatory reactions. Syndecan-1 positivity, on the other hand, was weak in areas with severe hemorrhage and necrosis. Based on the findings of this study, it was concluded that syndecan-1 release increased in liver damage induced by liver flukes, and these proteins might have a role in that damage. However, we believe that more comprehensive related studies would clarify the pathogenesis of the damage caused by liver flukes.

### Acknowledgments

The author would like to thank Prof. Dr. Mehtap Gul ALTAS ATIG for contributing to parasitological procedures during the study.

### Conflict of Interest

The authors stated that they did not have any real, potential or perceived conflict of interest.

### Ethical Approval

The authors declared that Research and Publication Ethical rules were followed.

## Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 10% as stated in the report uploaded to the system.

## Author Contributions

Motivation / Concept: NY  
 Design: NY  
 Control/Supervision: NY  
 Data Collection and / or Processing: NY, KF  
 Analysis and / or Interpretation: NY, KF  
 Literature Review: NY, KF  
 Writing the Article: NY, KF  
 Critical Review: NY, KF

## References

- Al-khafaji MA, et al., 2020: A retrospective survey with post mortem examination of liver fukes and lung hydatidosis in livestock in Babil, *Iraq Plant Archives*, 20 (2), 4537-4543.
- Belina D, Demissie T, Ashenafi H, Tadesse A, 2015: Comparative pathological study of liver fluke infection in ruminants. *Indian J Vet Pathol*, 39 (2), 113-120.
- Boray JC, 2017: Liver fluke disease in sheep and cattle. Primefact 446. In: Hutchinson, G.W., Love, S. (Eds.), NSW Depart Prim Indust, 1-14.
- Dar JS, Tak IR, Ganai BA, Shahardar RA, Gazanfar K, 2018: Gross pathological and histopathological changes in the liver and bile duct of Sheep with acute and chronic fasciolosis. *Int J Adv Res Sci Engg*, 7 (4), 2031-2044.
- Deger Y, et al., 2008: Lipid peroxidation and antioxidant potential of sheep liver infected naturally with distomatosis. *Türkiye Parazit Derg*, 32 (1), 23-26.
- Hayashida K, Chen Y, Bartlett AH, Park PW, 2008: Syndecan-1 is an in vivo suppressor of Gram-positive toxic shock. *J Biol Chem*, 283, 19895-19903.
- Kaplan RM, 2001: Fasciola hepatica: a review of the economic impact in cattle and considerations for control. *Vet Ther*, 2, 40-50.
- Khan SA, Muhammad S, Khan MM, Khan MT, 2015: Study on the prevalence and gross pathology of liver fluke infestation in sheep in and around Quetta District Pakistan. *Adv Anim Vet Sci*, 3 (3), 151-155.
- Kitila, DB, Megersa YC, 2014: Pathological and serum biochemical study of liver fluke infection in ruminants slaughtered at ELFORA Export Abattoir, Bishoftu, Ethiopia. *Global J Med Res*, 14, 6-20.
- Li J, Yuan T, Zhao X, Lv GY, Liu HQ, 2016. Protective effects of sevoflurane in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 29 (2), 300-307.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD, 2009: Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol*, 69, 41-146.
- Matsumoto A, Ono M, Fujimoto Y, Gallo RL, Bernfield M, Kohgo Y, 1997: Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential. *Int J Cancer*, 74, 482-491.
- Mendes EA, Vasconcelos AC, Lima WDS, 2012: Histopathology of Fasciola hepatica infection in Merionesunguiculatus. *Rev Patol Trop*, 41 (1), 55-62.
- Metwaly HA, Al-Gayyar MM, Eletreby S, Ebrahim MA, El-Shishtawy MM, 2012: Relevance of serum levels of interleukin-6 and syndecan-1 in patients with hepatocellular carcinoma. *Sci Pharm*, 80, 179-188.
- Nam EJ, Hayashida K, Aquino RS, Couchman JR, Kozar RA, Liu J, Park PW, 2017: Syndecan-1 limits the progression of liver injury and promotes liver repair in acetaminophen-induced liver injury in mice. *Hepatology*, 66 (5), 1601-1615.
- Okoye IC, Egbu FMI, Ubachukwu PO, Obiezue NR, 2015: Liver histopathology in bovine Fascioliasis. *Afr J Biotechnol*, 14 (33), 2576-2582.
- Oyarzún-Ruiz, Pablo, et al., 2014: Histopathological findings of Fasciola hepatica infection in non-native European hare (*Lepus europaeus*) in Southern Chile. *Rev Bras Parasitol Vet*, 28, 145-150.
- Rahko T, 1969: The pathology of natural Fasciola hepatica infection in cattle. *Pathol Vet*, 6 (3), 244-256.
- Regos E, Karázi K, Reszegi A, Kiss A, Schaff Z, Baghy K, Kovalszky I, 2020: Syndecan-1 in liver diseases. *Pathol Oncol Res*, 26 (2), 813-819.
- Roskams T, Rosenbaum J, De Vos RITA, David G, Desmet V, 1996: Heparan sulfate proteoglycan expression in chronic cholestatic human liver diseases. *Hepatology*, 24 (3), 524-532.
- Schweizer G, Braun U, Deplazes P, Torgerson PR, 2005: Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Vet Rec*, 157, 188-193.
- Slifko TR, Smith HV, Rose JB, 2000: Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol*, 30, 1379-93.
- Talukder S, et al., 2010: Pathological investigation of liver fluke infection of slaughtered black Bengal goat in a selected area of Bangladesh. *Bangladesh J Vet Med*, 8 (1), 35-40.
- Xia J, Jiang S-c, Peng HJ, 2015: Association between Liver Fluke Infection and Hepatobiliary Pathological Changes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 10 (7), e0132673.
- Zvibel I, Halfon P, Fishman S, Penaranda G, Leshno M, Or AB, Halpern Z, Oren R 2009: Syndecan 1 (CD138) serum levels: a novel biomarker in predicting liver fibrosis stage in patients with hepatitis C. *Liver Int*, 29, 208-212.

\*Correspondence: Nihat YUMUSAK

Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Harran, Sanliurfa, Turkey

e-mail: nihatyumusak@harran.edu.tr

## Investigating Relationships between Catalase, Reduced Glutathione, Malondialdehyde, Vitamin C, and Total Protein Levels in Simmental Cow's Milk and Milk Cells

Filiz KAZAK<sup>1,a,\*</sup>, Pınar COSKUN<sup>1,b</sup>

<sup>1</sup>Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Hatay, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-9065-394X; <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-6991-3727.

Geliş Tarihi: 08.03.2022

Kabul Tarihi: 25.04.2022

**Abstract:** In this study, to evaluate some antioxidant parameters of Simmental dairy cow's milk and milk cells, the catalase (CAT), reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), vitamin C (Vit C), and total protein (TP) were determined, and correlations between these parameters were revealed. The milk samples, collected from 28 clinically healthy cows from a private farm, were tested by CMT. Furthermore, CMT negative samples were included in the study. Briefly, milk cells were isolated from 15 mL of milk by centrifugation, and then they were sonicated. Milk and milk cell CAT activities, GSH, MDA, Vit C, and TP levels were determined by spectrophotometric methods. TP levels were  $0.043 \pm 0.008$  mg in milk cell of 1 mL milk and  $34.28 \pm 0.656$  mg/mL in milk. GSH levels were  $21.19 \pm 1.834$  nmol/mg protein in milk cells and  $25.78 \pm 3.054$  nmol/mL in milk. CAT activities were  $0.13 \pm 0.017$  U/mg protein in milk cells and  $2.391 \pm 0.277$  U/mL in milk. MDA levels were  $2.27 \pm 0.180$  nmol/mL and Vit C levels were  $68.89 \pm 4.226$  µg/mL in milk. As regards correlations: Milk cell GSH and milk GSH levels were negatively correlated with milk cell TP levels ( $p < 0.01$ ). Milk cell GSH levels were positively correlated with milk GSH levels ( $p < 0.05$ ). Milk Vit C levels were positively correlated with milk TP levels ( $p < 0.01$ ). Although it was weak, there was a positive correlation between milk CAT activities and milk Vit C levels ( $p = 0.05$ ). In conclusion, some biochemical parameters (CAT, GSH, MDA, Vit C, and TP) of Simmental cow's milk and milk cells were evaluated and discussed in the present study. It is thought that udder health will be positively affected by increasing the antioxidant capacity of milk cells.

**Keywords:** CAT, GSH, MDA, Simmental milk cell, Vit C.

### Simmental İnek Sütü ve Süt Hücrelerinde Katalaz, İndirgenmiş Glutatyon, Malondialdehit, Vitamin C ve Total Protein Düzeyleri Arasındaki İlişkilerin Araştırılması

**Özet:** Bu çalışmada, Simmental inek sütü ve süt hücrelerinin bazı antioksidan parametreleri, katalaz (CAT) aktiviteleri, indirgenmiş glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), vitamin C (Vit C) ve total protein düzeylerinin belirlenmesi ve bu parametreler arasındaki korelasyonların ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Özel bir çiftlikten klinik olarak sağlıklı 28 inekten toplanan süt örnekleri (her biri 15 mL), California Mastitis Testi (CMT) ile test edilmiş ve CMT negatif örnekler çalışmaya dahil edilmiştir. Kısaca, süt hücreleri santrifüjleme ile 15 mL süttten izole edildi ve ardından sonikasyona tabi tutuldu. Süt ve süt hücresi CAT aktiviteleri, GSH, MDA, Vit C ve TP seviyeleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlendi. TP seviyeleri 1 mL sütün süt hücresinde  $0.043 \pm 0.008$  mg ve sütte  $34.28 \pm 0.656$  mg/mL belirlendi. GSH seviyeleri süt hücrelerinde  $21.19 \pm 1.834$  nmol/mg protein, sütte  $25.78 \pm 3.054$  nmol/mL ölçüldü. CAT aktiviteleri süt hücrelerinde  $0.13 \pm 0.017$  U/mg protein ve sütte  $2.391 \pm 0.277$  U/mL bulundu. Sütte MDA seviyeleri  $2.27 \pm 0.180$  nmol/mL, Vit C seviyeleri sütte  $68.89 \pm 4.226$  µg/mL belirlendi. Korelasyonlar açısından: Süt hücresi GSH ve süt GSH seviyeleri, süt hücresi TP düzeyleri ile negatif korelasyon gösterdi ( $p < 0.01$ ). Süt hücresi GSH seviyeleri, süt GSH seviyeleri ile pozitif korelasyon gösterdi ( $p < 0.05$ ). Süt Vit C seviyeleri ile süt TP seviyeleri arasında pozitif korelasyon vardı ( $p < 0.01$ ). Zayıf olmasına rağmen süt CAT aktiviteleri ile süt Vit C düzeyleri arasında pozitif korelasyon vardı ( $p = 0.05$ ). Sonuç olarak, sunulan çalışmada Simmental inek sütü ve süt hücrelerinin bazı biyokimyasal parametreleri (CAT, GSH, MDA, VitC ve TP) değerlendirildi ve tartışıldı. Süt hücrelerinin antioksidan kapasitelerinin artırılabilmesi sayesinde meme sağlığının olumlu etkileneceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** CAT, GSH, MDA, Simmental süt hücresi, Vit C.

### Introduction

Nowadays, it has been mentioned that oxidized flavor in milk proceeds a common problem affecting the dairy industry due to its adverse effect on milk acceptability (Gutierrez et al., 2018). Milk is considered a precious element of a complete diet and a rich nutrient source including, bioactive peptides, protein, conjugated linoleic acid, omega-3

fatty acid, vitamins, calcium, and selenium. These components are available in milk, play an essential role in physiological activities, and act as anti-cancer, anti-inflammatory, antimicrobial, and antioxidant (Khan et al., 2019).

The antioxidant capacity of milk is mainly due to non-enzymatic antioxidants such as glutathione,



vitamins (vitamin A, C, E), carotenoids, and also antioxidant enzymes that include catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) (Grażyna et al., 2017; Zivkovic et al., 2015). Lipid peroxidation negatively affects the quality of milk. The end products of lipid peroxidation as a biological lipid (omega-3 and omega-6 fatty acids) oxidation are reactive aldehydes, such as malondialdehyde (MDA) (Kapusta et al., 2018). The presence of antioxidants in milk may inhibit the free radical mechanism by donating the proton and thus prevent the onset of autoxidation (Khan et al., 2019). Reduced glutathione (GSH), a key component of the antioxidant system, converts dehydroascorbate to ascorbate and supports antioxidant defenses and detoxification (Szarka et al., 2012). Vitamin C (Vit C) is the primary and most essential water-soluble antioxidant present in milk that is readily oxidized at the pH of milk (Zivkovic et al., 2015) and possesses a strong affinity to scavenge free radicals such as superoxide, iron oxide, nitric oxide, and alkoxy radicals (Gutierrez et al., 2018). One of the most active milk enzymes, CAT, a heme protein, converts hydrogen peroxide to water and oxygen. Synergistic interactions among antioxidants impart high antioxidant potential to milk and efficaciously protect milk fat against oxidation (Grażyna et al., 2017). Shortly, milk includes plenty of enzymatic and non-enzymatic antioxidant compounds (Zivkovic et al., 2015).

All types of milk contain a specific level of somatic cells (Hamed et al., 2008). Milk somatic cells play a protective role opposite to diseases in the mammary gland (Kehrl and Shuster, 1994). Somatic cells count in milk changes depending on the calving season, and also, it is thought that somatic cell count in milk is a poor indicator of the milk quality (Khastayeva et al., 2021). Hamed et al. (2008) found the relationship between milk somatic cell counts and antioxidant enzymes in bovine milk. Akalın et al. (2019) determined the antioxidant potential of Holstein cow milk cells by determining the levels of antioxidants. Moreover, milk protein is an essential indicator of milk quality (Khastayeva et al., 2021). Nevertheless, the oxidant-antioxidant potential of Simmental cow milk cells by determining the levels of MDA, Vit C, GSH, and CAT activity has not yet been fully considered in Simmental cows. The main aim of the present study was to evaluate MDA levels and antioxidant capacities of Simmental dairy cow's milk and milk cells. Therefore, CAT activity, the levels of GSH, MDA, Vit C, and total protein (TP) of milk and milk cells were determined and correlations between these parameters were evaluated in the present study.

## Material and Methods

Milk samples were collected from 28 clinically healthy Simmental cows aged between 4 and 5 (in 2. and 3. lactation period). They were fed in the same care and nutritional conditions in a private intensive breeding farm in January in the Hatay region (36° 11' 56" North, 36° 9' 38" East). The commercial feed used in the farms is mainly corn silage and contains complementary milk feed, beet pulp, alfalfa hay, barley flakes, corn flakes, and hay (Table 1). The nutrient composition of complementary bovine milk (Simmental special feed, CP 9730, Turkey) feed is given in Table 2.

**Table 1.** The foodstuffs of the daily ration.

Foodstuffs	Quantity kg/day
Corn silage	14
Complementary milk feed	7
Beet pulp	6
Alfalfa hay(dried)	5.75
Barley flakes	1.5
Corn flakes (69 %starch)	1.5
Hay	1.5

**Table 2.** The nutrient composition of bovine complementary milk feed.

Crude protein	19%
Crude ash	7%
Crude cellulose	7%
Crude fat	3.2%
Calcium	1%
Phosphorus	0.7%
Sodium	0.4%
Vitamin A	20.000 IU/kg
Vitamin D3	3.000 IU/kg
Vitamin E	80 mg/kg

Milk samples were collected from the right-front lobe of clinically healthy udders between 09:00 and 10:00 am. During milking, the first 2-3 squeezes of milk were thrown away after the teat was wiped with 70% alcohol cotton. The milk samples were tested by California Mastitis Test (CMT), and CMT negative samples were included in the study.

Collected milk samples (15 mL each) were brought to the biochemistry laboratory in the cold chain and centrifuged at 2300 rpm for 10 minutes at 4°C. After centrifugation, skimmed milk (supernatant) was collected by removing the upper layer of fat with a scraper and used in the assays. The cell pellet was washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged at 2300 rpm for 10 minutes at +4°C. Finally, the supernatant was removed, and the remaining pellet was completed to 1.5 mL with PBS and sonicated (Bandelin Sonopuls HD 2070, Germany) (Akalin et al., 2016) for four repetitions of 10 seconds each, with a 30 seconds cooling period (on ice) between each repetition. By this process, milk cells in 15 mL of milk were concentrated in 1.5 mL PBS (10 times concentrated). After sonication, the homogenates were centrifuged at 7500 rpm for 20 minutes at +4°C. Milk cell supernatant was used for further analysis. Skimmed milk and milk cell CAT activity, GSH, MDA, Vit C, and TP levels were determined by spectrophotometric methods (UV 2100 UV-VIS Recording Spectrophotometer Shimadzu, Japan).

#### Determination of Total Protein (TP) Levels:

Total protein levels were assayed by Lowry's (1951) method spectrophotometrically by determining the absorbance at 700 nm. Bovine serum albumin (Merck 112018, Germany) was used as a standard. The results are given as mg/milk cells of 1 mL milk for milk cell and mg/mL for milk.

#### Determination of Reduced Glutathione (GSH) Levels:

Reduced glutathione levels were analyzed according to Ellman's (1959) method. It is a kinetic method based on the principle of the reduction of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic) acid to trinitrobenzene by glutathione. The optical density of the reduced disulfide compound absorbance at 412 nm can be measured by spectrophotometry. The results are presented as nmol/mg protein for milk cells and nmol/mL for milk.

#### Determination of Catalase (CAT) Activities:

Catalase activities were determined using the method developed by Aebi (1984). Catalase is an enzyme that dissociates hydrogen peroxide into molecular oxygen and water. Catalase activities are usually proportional to the amount of dissociation of hydrogen peroxide. The activity measurement was monitored by the decrease in absorption at 240 nm. The results are presented as U/mg protein for milk cells and U/mL for milk.

#### Determination of Malondialdehyde (MDA) Levels:

Malondialdehyde levels were determined spectrophotometrically according to the method proposed by Ohkawa et al. (1979). It is based on spectrophotometric measurement at 532 nm of the pink complex formed by MDA with TBA, which is the secondary product of lipid peroxidation, as a result

of incubation of sample in a boiling water bath for one hour under aerobic conditions and at pH:3.5. The results are presented as nmol/mL for milk.

#### Determination of Vitamin C (Vit C) Levels:

Vitamin C levels were calculated according to the manual spectrophotometric method of Haag (1985). Ascorbic acid (Vitamin C) is converted to dehydroascorbic acid with mild oxidizing agents, and dehydroascorbic acid slowly converts to diketogulonic acid in mild acid solutions. Dehydroascorbic acid and diketogulonic acid react with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to form bis 2,4-dinitrophenylhydrazone. The results are given as µg/mL for milk.

**Statistics:** The values obtained were evaluated by Windows Statistical Package for the Social Sciences program (IBM SPSS 22 version, USA), and descriptives (Mean and Standard Error (SE)) were evaluated. Because some data were not distributed normally, Spearsman's correlation was performed for correlation analysis, and P<0.05 indicated statistical significance.

## Results

Some biochemical parameters in milk cells (Table 3) and milk (Table 4) were presented. Total protein levels were 0.04 ± 0.008 mg in milk cells of 1 mL milk and 34.28 ± 0.656 mg/mL in milk. GSH levels were 21.19 ± 1.834 nmol/mg protein in milk cells and 25.78 ± 3.054 nmol/mL in milk. CAT activities were 0.13 ± 0.017 U/mg protein in milk cells and 2.391 ± 0.277 U/mL in milk. MDA levels were 2.27 ± 0.180 nmol/mL in milk, and Vit C levels were 68.89 ± 4.226 µg/mL in milk. MDA and Vit C levels were under the determination limit in supernatants of milk cells obtained from 15 mL of milk. Dairy milk yield was 24.61 ± 0.28 L.

Table 3. Some biochemical parameters in Simmental dairy cow's milk cells.

Parameters	Mean	SE	n
TP (mg/milk cells of 1 mL milk)	0.043	0.008	28
GSH (nmol/mg protein)	21.19	1.83	28
CAT (U/mg protein)	0.13	0.02	28

Table 4. Some biochemical parameters in Simmental dairy cow's milk.

Parameters	Mean	SE	n
TP (mg/mL)	34.28	0.66	28
GSH (nmol/mL)	25.78	3.05	28
CAT (U/mL)	2.391	0.28	28
Vit C (µg/mL)	68.89	4.23	28
MDA (nmol/mL)	2.27	0.18	28

TP: Total protein, GSH: Reduced glutathione, CAT: Catalase Vit C: Vitamin C, MDA: Malondialdehyde.

The correlations between the biochemical parameters are presented in Table 5. As regards correlations: Milk cell GSH ( $r=-0.684$ ,  $p<0.01$ ) and milk GSH ( $r=-0.487$ ,  $p<0.01$ ) levels were negatively correlated with milk cell TP levels. Milk cell GSH levels were positively correlated with milk GSH levels

( $r=0.475$ ,  $p<0.05$ ). Milk Vit C levels were positively correlated with milk TP levels ( $r=0.509$ ,  $p<0.01$ ). Although it was weak, there was a positive correlation between milk CAT activity and milk Vit C levels ( $r=0.374$ ,  $p=0.05$ ).

**Table 5.** Correlations between the parameters (Spearsman's correlation test).

	Milk TP (mg/mL)	Milk cell GSH (nmol/mg protein)	Milk GSH (nmol/mL)	Milk Cell CAT (U/mg protein)	Milk CAT (U/mL)	Milk MDA (nmol/mL)	Milk Vit C (µg/mL)
Milk Cell TP (mg/milk cells of 1 mL milk)	0.150	-0.684**	-0.487**	-0.256	0.029	0,000	-0.170
Milk TP (mg/mL)		0.040	-0.026	-0.021	0.301	0.094	0.509**
Milk Cell GSH (nmol/mg protein)			0.475*	0.289	0.181	0.018	0.174
Milk GSH (nmol/mL)				0.112	0.134	0.095	0.083
Milk cell CAT (U/mg protein)					-0.024	0.334	-0.102
Milk CAT (U/mL)						0.200	0.374*
Milk MDA (nmol/mL)							0.211

TP: Total protein, GSH: Reduced glutathione, CAT: Catalase Vit C: Vitamin C, MDA: Malondialdehyde. \* $P=0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

## Discussion

Milk protein is an essential indicator of the quality of milk (Khastayeva et al., 2021). Total protein levels were 34.28 mg/mL in milk in this study. Studies determining the TP levels of milk cells are pretty limited. In the study conducted on Holstein cow milk cells (Akalin et al., 2019), the TP levels were determined as 0.374 mg/1 mL cell supernatant in the cell pellet obtained by taking 50 mL of cow milk and concentrating it into 2 mL PBS. In the present study, the TP levels were calculated at 0.043 mg/1 mL cell supernatant in 15 mL milk concentrated with 1.5 mL PBS. Simmental cow milk was found to be approximately threefold lower than the levels in Holstein cow milk. The determination of low total protein levels in Simmental cow milk cells compared to Holstein cow milk may be related to the difference in milk cell components due to some age, lactation period, and breed properties. Reduced glutathione (GSH) protects cells against free radicals, reactive oxygen species, endogenous and exogenous toxic compounds (Meister and Anderson, 1983). In the current study, GSH levels were  $25.78 \pm 3.05$  nmol/mL in milk. GSH levels ( $21.19 \pm 1.83$  nmol/mg protein) were found to be lower than the levels reported for Holstein cow milk cells ( $142.16 \pm 37.06$  nmol/mg protein) (Akın et al., 2019). Milk cell GSH levels were positively correlated with milk GSH levels ( $r=0.475$ ,

$p<0.05$ ). No study on the correlation between GSH levels in milk cells and milk was found in the literature review. While Akın et al. (2019) reported no significant correlation of TP levels with GSH levels in Holstein cow milk cells, in this study milk cell TP levels were negatively correlated with milk cell GSH ( $r=-0.684$ ,  $p<0.01$ ) and milk GSH ( $r=-0.487$ ,  $p<0.01$ ) levels. There was no literature regarding the relation between total protein and GSH levels in biological fluids.

Catalase has been reported to play a central role in milk redox control (Silanikove et al., 2005). One of the most active milk enzymes, CAT, a heme protein, converts hydrogen peroxide to water and oxygen (Grażyna et al., 2017). In the present study, CAT activities were  $0.13 \pm 0.017$  U/mg protein in milk cells and  $2.39 \pm 0.28$  U/mL in milk. A few studies (Hamed et al., 2008; Kitchen et al., 1970) reported a positive correlation between the CAT activity and the milk somatic cell counts, whereas no relationship was observed in a study (Phillips and Griffiths, 1987) between those two parameters.

Vitamin C is a water-soluble vitamin that causes the reduction of compounds such as molecular oxygen, nitrate, cytochrome a, and c and is capable of reacting with free radicals in aqueous environments. It reacts with superoxide and hydroxyl radicals and forms the first antioxidant defence against oxidant agents (Khan et al., 2019). In



the current study, lactating Simmental cow Vit C levels ( $68.89 \pm 4.23 \mu\text{g/mL}$ ) were found to be higher than the levels reported for lactating Holstein cows ( $23.78 \pm 0.55$  and  $22.87 \pm 1.20 \mu\text{g/mL}$ ) (Akalin et al., 2016; Weiss et al., 2004). In the study conducted on Holstein cow milk cells (Akalin et al., 2016), the Vit C levels were determined as  $1.18 \mu\text{g/mL}$  milk cell obtained by taking 50 mL of cow milk and concentrating it into 2 mL PBS. Vit C levels were under the determination limit in supernatants of milk cells obtained from 15 mL milk Simmental cow milk and concentrated into 1.5 mL PBS. The difference in Vit C level determination in Simmental cow milk cell compared to Holstein cow milk cell may be related to either amount of milk for measurement or some properties such as breed.

Milk antioxidants interact effectively by forming an antioxidant network (Grażyna et al., 2017). We found a weak positive correlation between milk CAT activity and milk Vit C levels ( $r=0.374$ ,  $p=0.056$ ). The appearance of ROS in milk initiates enzymatic protective and repair mechanisms (Grażyna et al., 2017). Antioxidants enter into particular interactions, boosting their activities and supporting mutual regeneration (Skibsted, 2012). It is thought that mentioned interactions between CAT and Vit C can effectively protect milk fat against oxidation and also diseases in the Simmental dairy cow mammary gland. Also, milk Vit C levels were positively correlated with milk TP levels ( $r=0.509$ ,  $p<0.01$ ). Sufficient literature information was not found to explain the positive correlation between milk Vit C and TP levels in the study.

Malondialdehyde is the final peroxidation product of fatty acids with multiple double bonds found in cell and organelle membranes. Increasing peroxidation of lipids by free radicals in membranes causes an increase in MDA levels. Malondialdehyde and other lipid peroxides can react with DNA or proteins and disrupt their structure (Gaweł et al., 2004). Lipid peroxidation negatively affects the quality of milk. The end products of lipid peroxidation as a biological lipid (omega-3 and omega-6 fatty acids) oxidation are reactive aldehydes, such as MDA (Kapusta et al., 2018). In our previous study (Kazak et al., 2021), goat milk cell MDA levels were determined as  $1.43 \pm 0.35 \text{ nmol/mg}$  protein, whereas Simmental milk cell MDA levels were not determined in this study. This situation may be because healthy goat milk has a higher number of somatic cells than cow milk (Podhorecká et al., 2021). Moreover, no study on MDA levels in cow milk cells was found in the literature review. In the present study, milk MDA level was measured as  $2.27 \pm 0.18 \text{ nmol/mL}$ . There was no correlation between MDA levels and other parameters in the study.

## Conclusion

In conclusion, some of the antioxidant parameters of Simmental cow milk cells were evaluated for the first time. This study suggests that the milk Vit C-milk CAT and milk cell GSH-milk GSH levels are the essential coherent pathways for reactive oxygen metabolite neutralization in the milk of Simmental dairy cows. This study suggested that revealing the antioxidant potential of Simmental cow milk may be beneficial to understanding the Simmental milk cell defense mechanism. It can also be suggested that increasing the antioxidant potential of milk cells may protect dairy cows in terms of breast health. Lastly, further studies are required to clarify the oxidant-antioxidant mechanism of milk by revealing the interaction between the antioxidant capacities of the milk and milk cells in different dairy bovine species.

## Conflict of Interest

The authors stated that they did not have anyreal, potential or perceived conflict of interest.

## Ethical Approval

This study is not subject to HADYEK permission in accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees".

## Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 15% as stated in the report uploaded to the system.

## Explanation

It was presented as a summary paper at the Second International Congress on Biological and Health Sciences (ICBH) 24-27 February 2022.

## Author Contributions

Motivation / Concept: FK, PC  
Design: FK, PC  
Control/Supervision: PC  
Data Collection and/or Processing: FK, PC  
Analysis and / or Interpretation: FK, PC  
Literature Review: FK  
Writing the Article: FK  
Critical Review: PC

## References

- Aebi H, 1984: Catalase. *Methods Enzymol*, 105, 121–126.
- Akalın PP, Başpınar N, Çoyan K, Bucak MN, Güngör Ş, Öztürk C, 2016: Effects of ultrasonication on damaged spermatozoa and mitochondrial activity rate. *Turk J Vet Anim Sci*, 40, 195–199.
- Akalın PP, Ergün Y, Başpınar N, Doğruer G, Küçükgül A, Cantekin Z, İlgör M, Sarıbay M, Koldaş E., Baştan A, Salar S, Pehlivanlar S, 2019: Glucose 6 phosphate dehydrogenase glutathione peroxidase total glutathione and reduced nicotinamide dinucleotide phosphate in milk cells of subclinical mastitic cows. *Pol J Vet Sci*, 22 (2), 271–278.
- Akın Z, Akalın PP, Kazak F, Ergün Y, Başpınar N, 2019: The relationships of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, Glutathione Peroxidase, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate and Glutathione with Milk Quality Parameters. *Atatürk University J Vet Sci*, 14 (2), 193–200.
- Ellman G, 1959: Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82 (1), 70–77.
- Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P, 2004: Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek*, 57 (9-10), 453–455.
- Grażyna C, Hanna C, Adam A, Magdalena BM, 2017: Natural antioxidants in milk and dairy products. *Int J Dairy Technol*, 70 (2), 165–178.
- Gutierrez AM, Boylston TD, Clark S, 2018: Effects of Pro-Oxidants and Antioxidants on the Total Antioxidant Capacity and Lipid Oxidation Products of Milk During Refrigerated Storage. *J Food Sci*, 83 (2), 275–283.
- Haag W, 1985: Zur methodik und praktischen Bedeutung der Vitamin C - Bestimmung bei im Rind in Vergangenheit und Gegenwart. Inaugural Dissertation. Justus Liebig Universität, Giessen.
- Hamed H, El Feki A, Gargouri A, 2008: Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with antioxidant factors. *C R Biol*, 331 (2), 144–151.
- Kapusta A, Kuczyńska B, Puppel K, 2018: Relationship between the degree of antioxidant protection and the level of malondialdehyde in high-performance Polish Holstein-Friesian cows in peak of lactation. *PLoS One*, 13 (3), e0193512.
- Kazak F, Karafakioğlu YS, Akalın PP, 2021: Investigating Antioxidant Potential of Goat Milk Cells: Activities of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, Glutathione Peroxidase and Levels of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Total Glutathione, Malondialdehyde and Vitamin C. ICBH Abstract Book, pp.146.
- Kehrli ME, Shuster DE, 1994: Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *Int J Dairy Sci*, 77 (2), 619–627.
- Khan IT, Bule M, Ullah R, Nadeem M, Asif S, Niaz K, 2019: The antioxidant components of milk and their role in processing, ripening, and storage: Functional food. *Vet World*, 12 (1), 12–33.
- Khastayeva AZ, Zhamurova VS, Mamayeva LA, Kozhabergenov AT, Karimov NZ, Muratbekova KM, 2021: Qualitative indicators of milk of Simmental and Holstein cows in different seasons of lactation. *Vet World*, 14 (4), 956–963.
- Kitchen BJ, Taylor GC, White IC, 1970: Milk enzymes: their distribution and activity. *J Dairy Res*, 37 (2), 279–288.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951: Protein measurement with pholin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 (1), 265–275.
- Meister A, Anderson ME, 1983: Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 52, 711–760.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, 1979: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95 (2), 351–358.
- Phillips JD, Griffiths MW, 1987: A note on the use of the Catalasemetre in assessing the quality of milk. *J Appl Bacteriol*, 62 (3), 223–226.
- Podhorecká K, Borková M, Šulc M, Seydlová R, Dragounová H, Švejcarová M, Peroutková J, Elich O, 2021: Somatic Cell Count in Goat Milk: An Indirect Quality Indicator. *Foods*, 10 (5), 1046.
- Silanikove N, Shapiro F, Shamay A, Leitner G, 2005: Role of xanthine oxidase, lactoperoxidase, and NO in the innate immune system of mammary secretion during active involution in dairy cows: manipulation with casein hydrolyzates. *Free Radic Biol Med*, 38 (9), 1139–1151.
- Skibsted LH, 2012: Vitamin and non-vitamin antioxidants and their interaction in food. *J Food Drug Anal*, 20 (1), 355–358.
- Szarka A, Tomasskovic B, Bánhegyi G, 2012: The ascorbate-glutathione- $\alpha$ -tocopherol triad in abiotic stress response. *Int J Mol Sci*, 13 (4), 4458–4483.
- Weiss WP, Hogan JS, Smith KL, 2004: Changes in vitamin C concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of Escherichia coli. *J Dairy Sci*, 87 (1), 32–37.
- Zivkovic JV, Sunaric S, Trutic N, Denić M, Kocić G, Jovanović T, 2015: Antioxidants and Antioxidant Capacity of Human Milk. *Acta Fac Med Naissensis*, 32 (2), 115–125.

\*Correspondence: Filiz KAZAK

Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Hatay, Turkey

e-mail: drfilizkazak@gmail.com

## The Effect of Pistachio Shell, Pomegranate Hull, and Olive Pulp Feeding on Milk Yield, Milk Quality, and Some Biochemical Blood Parameters in Sheep

Mücahit KAHRAMAN<sup>1,a,\*</sup>, Ebru SAKAR<sup>2,b</sup>, Sabri YURTSEVEN<sup>3,c</sup>, Aydın DAŞ<sup>1,d</sup>, Hamza YALÇIN<sup>4,e</sup>, Mehmet AVCI<sup>5,f</sup>, Gülşah GÜNGÖREN<sup>1,g</sup>, Besime DOĞAN DAŞ<sup>5,h</sup>, Adem ŞAHAN<sup>6,i</sup>, Kasım TAKIM<sup>7,j</sup>, Bekir EROL AK<sup>2,k</sup>

<sup>1</sup>Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Husbandry, Şanlıurfa, Turkey.

<sup>2</sup>Harran University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Şanlıurfa, Turkey.

<sup>3</sup>Harran University, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Şanlıurfa, Turkey.

<sup>4</sup>Harran University, Faculty of Agriculture, Department of Biostatistics, Şanlıurfa, Turkey.

<sup>5</sup>Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Şanlıurfa, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-7757-2483; <sup>b</sup>ORCID: 0000-0001-6622-6553; <sup>c</sup>ORCID: 0000-0002-6600-8772; <sup>d</sup>ORCID: 0000-0003-0371-5434; <sup>e</sup>ORCID: 0000-0003-0733-7821; <sup>f</sup>ORCID: 0000-0002-2523-2137; <sup>g</sup>ORCID: 0000-0002-0360-7735; <sup>h</sup>ORCID: 0000-0003-2163-2632; <sup>i</sup>ORCID: 0000-0002-4779-0893; <sup>j</sup>ORCID: 0000-0003-4631-1982; <sup>k</sup>ORCID: 0000-0001-6938-942X.

Geliş Tarihi: 30.03.2022

Kabul Tarihi: 09.06.2022

**Abstract:** This study was carried out to determine the effect of different industrial by-products (pistachio, pomegranate, and olive) as alternative feed sources for sheep. Fifty-two Awassi sheep aged 3 and 4 years were divided into four groups (n=13 per group) concerning age, birth type, milk yield, and lactation period: basal diet without byproducts (CON) and basal diet added with either pistachio shell (PIS), pomegranate hull (POM), or olive pulp (OP). By-products were mixed with the total ration at a rate of 5% and given in the morning and evening feedings. The feeding experiment was continued for 60 days. Milk yield, milk quality, feed consumption, and biochemical parameters such as urea, creatine, triglyceride, total bilirubin, and albumin were determined at 30-day intervals from the beginning of the study. Tukey multiple comparison test was used to compare the research groups. There was no treatment effect on feed consumption. The highest milk yield was measured in sheep fed the POM diet in all periods (the first, second, and third-period means were 1143±111, 967±127, and 785±112 gr, respectively). Milk yield for other groups was similar. At the end of the study, the fat ratio in the CON, PIS, POM, and OP groups were determined to be 6.11±0.30%, 6.25±0.36%, 5.61±0.42%, and 5.97±0.48%, respectively. Protein values were determined as 6.34±0.16%, 6.26±0.27%, 6.06±0.23%, and 6.39±0.19% in the same order. There was no statistically significant difference between CON, PIS, POM, and OP groups regarding biochemical parameters. In conclusion, sheep ration can contain PIS, POM, and OP up to 5% as alternative feed sources.

**Keywords:** Food waste, Olive pulp, Pistachio shell, Pomegranate hull, Sheep milk quality.

### Koyunlarda Fıstık Kabuğu, Nar Kabuğu ve Zeytin Pirinası ile Beslemenin Süt Verimi, Süt Kalitesi ve Bazı Kan Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkisi

**Özet:** Bu çalışma, farklı endüstriyel yan ürünlerin (fıstık, nar ve zeytin) koyunlarda alternatif yem kaynakları olarak etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Araştırmada 3 ve 4 yaşlı 52 baş (her grup için n=13) İvesi ırkı koyun ilave yan ürün içermeyen bazal diyet (CON), fıstık kabuğu (PIS), nar kabuğu (POM) ve zeytin pirinası (OP) içeren rasyonlarla beslendi. Yan ürünler toplam rasyona %5 oranında karıştırılarak sabah ve akşam yemlemesinde verilmiştir. Yem denemesine 60 gün boyunca devam edilmiştir. Süt verimi, süt kalitesi, yem tüketimi ve üre, kreatin, trigliserit, total bilirubin, albümin gibi biyokimyasal parametreler çalışmanın başlangıcından itibaren 30 günlük aralıklarla belirlenmiştir. Araştırma gruplarının karşılaştırılmasında Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Yem tüketimi bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık oluşmamıştır. Süt verimi bakımından en yüksek değerler POM grubunda tespit edilmiştir (birinci, ikinci ve üçüncü periyotta sırasıyla 1143±111, 967±127 ve 785±112 gr). Süt verimi bakımından gruplarda birbirine benzer değerler saptanmıştır. Çalışma sonunda CON, PIS, POM ve OP gruplarındaki yağ oranı sırasıyla %6.11±0.30, %6.25±0.36, %5.61±0.42 ve %5.97±0.48 olarak belirlendi. Protein değerleri aynı sırayla %6.34±0.16, %6.26±0.27, %6.06±0.23 ve %6.39±0.19 olarak belirlendi. Biyokimyasal parametreler bakımından CON, PIS, POM ve OP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Sonuç olarak, koyun rasyonları alternatif yem kaynakları olarak %5'e kadar PIS, POM ve OP içerebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Fıstık kabuğu, Gıda atığı, Koyun süt kalitesi, Nar kabuğu, Zeytin pirinası.

## Introduction

Milk yield and composition in sheep are mainly determined by various factors, such as sheep breed,

lactation stage, milking system, and feeding (Inostroza et al., 2020). Nutrition level, which refers

to energy or feed intake level, is the main factor affecting milk yield and quality in sheep (Tzamaloukas et al., 2021). There is a positive relationship between milk yield and feed consumption (Kaufman et al., 2018). A balance must be maintained between the applications that would increase milk yield and reduce its content, which can be achieved by the optimal selection, ration, and herd management (Caja and Bocquier, 2000).

The rapid growth of the world population and the rise in living standards necessitate the large-scale production of high-quality animal-derived nutrients (Xie and Xu, 2019). In addition to improving the care and feeding of animals and their genetic structure, it is essential to identify products with the potential to be used as feed additives (Reda et al., 2021).

Olive, pomegranate, and pistachio production in the Southeast Anatolia region of Turkey is increasing every year. According to TUIK statistics, 240,000 tons of pistachios were produced in Turkey in 2018 (TUIK, 2018). According to the Ministry of Agriculture statistics, 52% of Turkey's pistachio production takes place in Şanlıurfa, which corresponds to approximately 70,000 tons, but when the average of the last five years is considered, the annual production is 38-42,000 tons (TUIK, 2015). The hull accounts for approximately 48% of the total weight of the pomegranate produced in this region, whereas the fruit, which is the edible part, accounts for 52%. Pomegranate hull is more valuable than its juice in ruminant feed (Sarica, 2011), and feeds such as pomegranate hull will be considered as an alternative supplement if animal feeding becomes difficult and feed sources become scarce. The number of olive trees in the Şanlıurfa province is increasing gradually. According to the 2018 data, 4,599 tons of olives from 1,585,994 trees were used for olive oil production, of which 70%-80% were olive pulp (TUIK, 2018). Raising awareness for transforming of these valuable plant parts, which are currently treated as agricultural waste, into products that will contribute to the country's economy is a current issue. In Turkey, the roughage problem appears from time to time during dry climatic periods. Therefore, it is necessary to determine the possibilities of using alternative products to wheat straw in animal production.

This study aimed to determine the possibility of using agricultural wastes obtained from pistachio, pomegranate, and olive fruits, which are widely produced in agricultural activities in the Southeastern Anatolia region, as a source of roughage for sheep. In addition, the effects of soft pistachio shell, pomegranate hull, and olive pulp on animal products and animal health were evaluated comparatively.

## Materials and Methods

**Animals:** Fifty-two sheep of the Awassi breed aged 3 and 4 years that gave birth at least twice were used as animal material. All the sheep used in the study gave birth to a singleton lamb. The average live weight of sheep in CON (Control), PIS (Pistachio shell), POM (Pomegranate hull), and OP (Olive pulp) groups are  $64.28 \pm 2.17$ ,  $63.89 \pm 1.48$ ,  $63.78 \pm 2.72$ , and  $64.17 \pm 1.69$  kg, respectively. The sheep used in the study were generally on the 75<sup>th</sup> day of lactation (days in milk:  $75.25 \pm 1.06$ ). They were divided into four groups (CON, PIS, POM, and OP) concerning age, birth type, milk yield, and lactation period. The lambs were separated from their mothers and fed by hand in the evening before the control days. The study was approved by the Harran University Animal Experiments Local Ethics Committee with Decision No. 2021-001/01.

**Rations:** Soft pistachio shell, pomegranate hull, and olive pulp used in the study were dried in a closed environment and ground in a feed mill machine. It was added to the daily ration and given to the sheep divided into four groups. The rations issued to sheep during the study included (1) a control diet without additional byproducts (CON), (2) PIS, (3) POM, and (4) OP. The rate of by-products to be included in the diet was 5 percent. A two-week feed habituation period was applied to the sheep. Feed consumption for groups was calculated as total mixed ration consumption. The entire ration was given to the sheep in two meals, at 6:00 a.m. and 6:00 p.m. The remaining amounts of feed were collected, weighed, and recorded daily before evening feeding. During the study, animals were provided with water and feed *ad libitum*. Table 1 shows the raw nutrient contents of POM, PIS, and OP used in the study, and Table 2 shows the contents of their rations and nutritional compositions.

**Milk Yield:** Milking was performed twice with a machine (Portable Milking System-Sezer, Turkey) at 08:00 a.m. and 08:00 p.m., and the milk amount was designated with a scale sensitive to 1 g (Yakan, 2012). The vacuum pressure of the milking machines was set to 40 kPa, the pulse rate to 120, and the pulsation ratio to 60:40. Before and after machine milking, routine practices related to milking hygiene were carried out. Milking of the control group to determine milk yield was done every 15 days from the beginning of lactation to the peak of lactation and every 30 days after the peak of lactation. With the help of interpolation from the data obtained on the control days, the daily milk yields of each sheep on days 15, 30, 45, 60, and 75 were determined. According to the data obtained, four homogeneous groups (CON, n = 13; PIS, n = 13; POM, n = 13; OP, n = 13) were formed, and the feeding trial continued

**Table 1.** Raw nutrient contents of Pistachio shell, Pomegranate hull, Olive pulp and Wheat straw used in the research.

Items	Pomegranate Hull	Pistachio Shell	Olive Pulp	Wheat Straw
DM (%)	81.39	76.07	31.07	92.01
CA (%)	5.51	7.07	5.10	8.04
CP (%)	3.64	6.44	6.81	3.95
CO (%)	9.75	8.78	5.96	1.22
ADF (%)	47.82	34.11	51.37	50.68
NDF (%)	56.33	36.89	69.10	79.81
ME Mcal/kg (DM)	2100	2000	2150	1025
N (mg/100g)	0.58	1.67	1.09	7.01
C (mg/100g)	42.40	44.37	46.03	0.14
H (mg/100g)	5.22	5.65	6.58	0.00
S (mg/100g)	0.00	0.00	4.86	1.5

DM: Dry Matter, CA: Crude Ash, CP: Crude Protein, CO: Crude Oil, ADF: Acid Detergent Fiber, NDF: Neutral Detergent Fiber, ME: Metabolic Energy, N: Nitrogen, C: Carbon, H: Hydrogen, S: Sulfur.

**Table 2.** Contents and nutrient compositions of the rations used in the research.

Items	Diets (%)			
Feed [(g/kg) DM]	CON	POM	PIS	OP
Concentrated Feed	62	61	63	66
Alfalfa	33	34	32	29
Wheat Straw	5	-	-	-
Pomegranate Hull	-	5	-	-
Pistachio Shell	-	-	5	-
Olive Pulp	-	-	-	5
Total	100	100	100	100
Analyzed Values (%)				
DM	94.75	94.59	94.07	92.14
CP	15.51	15.61	15.76	15.52
CS	22.67	22.04	22.93	21.00
CO	5.60	5.68	5.93	5.87
ME (Mcal/kg DM)	2253.76	2285.29	2280.32	2259.16

CON: Conrol, POM: Pomegranate Hull, PIS: Pistachio Shell, OP: Olive Pulp, Concentrated Feed: CP: %18, CS: %10, Ash: %10, CO: %3, Phosphorus: %0.5, Sodium: % 0.2, Vitamine A (IU/Kg): 5000, Vitamine D3 (IU/Kg): 700, Vitamine E (IU/Kg): 30 mg., DM: Dry Matter, CP: Crude Protein, CS: Crude Cellulose, CO: Crude Oil, ME: Metabolic Energy.

**Table 3.** Milk yield and milk quality characteristics in sheep during the research period (n=13 for each group).

Traits	Period	Diets (X±SEM)				P Value
		CON	PIS	POM	OP	
Milk Yield (g/d)	1	1140±94	1145±99	1143±111	1142±137	0.99
	2	858±122	941±121	967±127	801±108	0.75
	3	748±102	764±134	785±112	631±146	0.82
Daily Feed Intake (g/d)	1	2.43±0.07	2.58±0.11	2.52±0.11	2.48 ±0.07	-
	2	2.48±0.03	2.56±0.05	2.54±0.05	2.51 ±0.03	-
	3	2.50±0.01	2.53±0.01	2.60±0.01	2.54 ±0.01	-
Fat (%)	1	4.75±0.20	4.56±0.25	4.67±0.30	4.73±0.17	0.94
	2	6.70±0.18	6.86±0.45	6.06±0.33	6.44±0.32	0.36
	3	6.11±0.30	6.25±0.36	5.61±0.42	5.97±0.48	0.72
Protein (%)	1	5.35±0.12	5.21±0.09	5.15±0.15	5.39±0.13	0.53
	2	6.38±0.21	6.23±0.21	6.04±0.24	6.32±0.17	0.70
	3	6.34±0.16	6.26±0.27	6.06±0.23	6.39±0.19	0.73
Lactose (%)	1	5.10±0.07	5.23±0.06	5.23±0.04	5.01±0.07	0.05
	2	4.54±0.16	4.36±0.18	4.70±0.11	4.31±0.18	0.34
	3	4.41±0.21	4.44±0.16	4.50±0.10	4.02±0.31	0.38
Dry Matter (%)	1	16.2±0.2	16.1±0.3	16.1±0.3	16.2±0.3	0.96
	2	18.7±0.2	18.5±0.7	17.9±0.5	18.1±0.5	0.70
	3	17.9±0.5	18.9±0.5	17.2±0.6	17.4±0.8	0.75
Fat Free Dry Matter (%)	1	11.4±0.1	11.4±0.1	11.4±0.2	11.4±0.2	0.97
	2	11.9±0.1	11.6±0.3	11.7±0.2	11.6±0.2	0.75
	3	11.7±0.2	11.7±0.2	11.5±0.3	11.3±0.4	0.76
Urea	1	16.2±1.1	12.9±1.6	16.6±1.3	16.1±1.9	0.30
	2	23.6±0.9	23.6±2.0	21.6±1.3	23.9±1.9	0.73
	3	22.0±1.2	23.1±2.7	20.8±1.3	20.9±2.4	0.83
Somatic Cell Count x10 <sup>3</sup> Cell/ml	1	317±59	324±57	319±66	323±84	1.00
	2	506±91	565±127	434±63	473±108	0.81
	3	560±93	602±129	478±65	554±128	0.87
pH	1	5.79±0.02	5.75±0.03	5.79±0.01	5.74±0.02	0.44
	2	5.80±0.03	5.89±0.05	5.89±0.04	5.97±0.06	0.13
	3	5.86±0.04	5.88±0.04	5.91±0.04	6.01±0.08	0.21
L*	1	72.0±0.5	71.9±0.4	70.9±0.8	72.4±0.5	0.24
	2	72.7±0.3	72.3±0.5	71.8±0.6	73.3±0.4	0.18
	3	73.4±0.2	73.1±0.4	72.9±0.4	72.9±0.5	0.79
a*	1	-8.63±0.14	-8.85±0.16	-8.98±0.18	-8.29±0.22	0.05
	2	-8.25±0.15	-8.00±0.25	-8.25±0.27	-7.79±0.19	0.42
	3	-7.76±0.17	-7.38±0.21	-7.40±0.13	-7.29±0.15	0.23
b*	1	5.11±0.23	4.49±0.32	4.79±0.39	5.66±0.22	0.05
	2	5.47±0.14	5.08±0.40	5.56±0.48	6.01±0.36	0.38
	3	5.76±0.22	5.58±0.24	6.02±0.40	5.99±0.36	0.74

-: Statistical analysis was not applied because of group feeding. CON: Control, PIS: Pistachio Shell, POM: Pomegranate Hull, OP: Olive Pulp, 1: 1<sup>st</sup> Period, 2: 2<sup>nd</sup> Period, 3: 3<sup>rd</sup> Period.

**Table 4.** Biochemical parameters determined in sheep during the research period (n=13 for each group).

Parameters	Period	Diets (X±SEM)				P Value
		CON	PIS	POM	OP	
Urea (mg/dL)	1	27.7±2.3	27.1±4.1	28.4±2.1	28.4±1.6	0.98
	2	38.5±1.6	42.6±4.2	41.1±2.2	44.5±3.5	0.56
	3	37.5±2.1	41.8±5.8	40.7±2.5	44.2±4.9	0.72
Creatinine (mg/dL)	1	0.550±0.010	0.610±0.040	0.560±0.010	0.620±0.060	0.54
	2	0.590±0.010	0.670±0.070	0.590±0.010	0.620±0.040	0.51
	3	0.650±0.010	0.770±0.090	0.640±0.010	0.690±0.040	0.34
Triglyceride (mg/dL)	1	20.5±1.7	23.2±0.6	21.2±1.5	20.9±1.4	0.52
	2	13.2±0.9	15.2±0.8	14.2±1.3	17.9±3.3	0.33
	3	13.6±1.0	13.8±1.6	13.9±1.4	17.0±2.9	0.52
Total protein (g/dL)	1	7.43±0.13	7.04±0.15	7.33±0.14	7.50±0.18	0.48
	2	6.97±0.13	6.66±0.26	6.82±0.24	6.94±0.19	0.81
	3	7.66±0.12	7.51±0.11	7.68±0.17	7.59±0.12	0.86
Total bilirubin (g/dL)	1	0.140±0.000	0.150±0.000	0.18±0.010	0.160±0.010	0.96
	2	0.090±0.000	0.110±0.000	0.10±0.000	0.100±0.000	0.99
	3	0.050±0.000	0.050±0.000	0.04±0.000	0.030±0.000	0.86
Low density lipoprotein (mg/dL)	1	34.1±4.0	37.2±2.8	31.1±4.7	32.6±4.1	0.73
	2	26.7±1.6	22.0±1.3	25.4±2.5	22.8±1.6	0.21
	3	9.93±1.5	7.39±1.5	11.57±2.3	8.86±1.4	0.38
Lactate dehydrogenase (U/L)	1	426±16	426±16	408±18	447±20	0.69
	2	534±26	561±20	567±27	612±20	0.12
	3	577±21	618±17	592±46	587±34	0.29
Cholesterol (mg/dL)	1	58.3±2.4	61.2±3.7	62.6±3.4	65.6±3.8	0.82
	2	70.1±2.9	65.8±3.1	68.2±3.5	66.8±3.6	0.35
	3	70.2±3.0	70.7±3.1	74.2±4.4	72.8±3.9	0.35
High density lipoprotein (mg/dL)	1	51.9±3.4	52.1±3.8	51.6±2.9	53.8±3.1	0.72
	2	40.7±2.0	40.8±2.5	40.0±1.6	40.4±2.2	0.46
	3	57.6±3.0	60.5±2.9	60.6±2.7	60.5±3.2	0.40
Gamma glutamyl transferase (U/L)	1	72.5±2.7	66.2±3.4	65.3±6.1	64.8±7.8	0.77
	2	59.2±2.1	58.2±3.2	59.9±3.5	64.6±3.3	0.74
	3	56.2±2.2	57.3±2.5	60.9±3.0	61.6±2.8	0.12
Creatine kinase (mg/dL)	1	120±8.73	132±12	132±9	130±10	0.75
	2	219±29.34	258±28	244±17	240±24	0.92
	3	303±19.79	335±32	372±40	273±23	0.59
Aspartate transaminase (U/L)	1	95.9±3.3	97.0±4.5	91.0±5.1	98.0±4.6	0.47
	2	108.8±3.4	100.4±4.5	92.8±5.5	99.8±4.8	0.14
	3	121.9±5.6	121.6±5.2	108.6±6.2	115.0±5.4	0.82
Alanine aminotransferase (U/L)	1	18.5±1.8	20.5±1.7	20.4±1.9	20.8±2.0	0.18
	2	28.7±2.2	26.2±1.7	24.2±1.8	27.5±1.4	0.72
	3	30.7±2.7	26.7±1.8	26.4±1.4	28.8±1.5	0.81
Albumine (g/dL)	1	2.26±0.05	2.30±0.06	2.34±0.04	2.34±0.07	0.47
	2	2.40±0.03	2.43±0.04	2.40±0.06	2.39±0.05	0.16
	3	2.65±0.03	2.72±0.04	2.70±0.04	2.64±0.06	0.20

CON: Control, PIS: Pistachio Shell, POM: Pomegranate Hull, OP: Olive Pulp, 1: 1<sup>st</sup> Period, 2: 2<sup>nd</sup> Period, 3: 3<sup>rd</sup> Period.

for 60 days. The beginning of the study (first period), second period, and third period corresponded to the 75<sup>th</sup> day of lactation, 105<sup>th</sup> day of lactation, and 145<sup>th</sup> day of lactation, respectively.

**Milk Quality:** Milk quality parameters were dry matter, fat, lactose, urea, protein contents, and the number of somatic cells in milk. Microtab II chemical tablet, which does not affect the structure of milk, was added to these samples and sent to Şanlıurfa Raw Milk Analysis Laboratory in a cold chain the next day. Milk components (dry matter, fat, lactose, protein, and urea) and somatic cell count were determined using a Combi Milk Analyzer (Bentley, USA). A pH value was determined using a portable pH meter (Metler Toledo, Spain) immediately after morning milking on control days. 25 ml of milk samples were collected during morning milking on the control days and transported in a cold chain to the Laboratory of the Department of Genetics at Harran University Faculty of Veterinary Medicine to determine the color characteristics. Each of these samples was transferred to clean and transparent petri dishes, and color characteristics were determined with a portable color device (Colour Lite, Germany) (Kahraman and Yüceer Özkul, 2020).

**Biochemical Analysis:** Blood samples taken from the V. jugularis of the sheep before morning feeding were centrifuged at 4000 rpm for 15 minutes. Serum was separated and stored at -20 °C until analysis. Serum samples after this procedure are sent to the analysis laboratory (Yaşamlab, Adana/Turkey) in a cold chain. Biochemical analyzes were carried out on the laboratory's Abbott - Architect Ci8200 device. Architect ci8200 is an integrated system with an autosampler to provide clinical biochemistry tests.

**Statistical Analysis:** The data were analyzed using Levene and Shapiro-Wilk tests for equality of variances and normality assumption ( $P>0.05$ ), respectively (SPSS 24.0, SPSS Inc., NY, USA). The data (milk yield, milk quality, and biochemical parameters) were then analyzed using a General Linear Model and a Tukey HSD multiple comparison test for group mean comparisons. The data were presented as mean and standard error ( $X\pm SE$ ). The significant level for all tests was evaluated as  $P<0.05$ .

## Results

The values of milk yield, feed consumption, and milk quality characteristics determined in sheep during the study are shown in Table 3. The findings obtained from the study show the highest milk yield and feed consumption in the POM group, the highest milk fat ratio in the PIS group, and the highest protein content in the OP group. According to repeated measurements and variance analysis

results, the effect of the groups on milk yield and quality was not statistically significant ( $P>0.05$ ). The biochemical values determined from sheep serums are shown in Table 4. There was no statistically significant difference among the study groups in terms of biochemical values ( $P>0.05$ ).

## Discussion

Feed costs constitute approximately 70% of the production cost of raising livestock. In addition to increasing the amount and quality of the feed sources, using cheaper alternative feed sources are very important for economical animal breeding. Feeding is the most critical factor in determining milk yield and quality in farm animals raised for milk production (Ramírez-Rivera et al., 2019). Milk yield and content are affected by factors such as the amount and quality of roughage in the diet, roughage/concentrated feed ratio, particle size, amount and type of fat added to the ration, protein source, and carbohydrate source of the ration (Ergül et al., 2019). The present study evaluated the potential of using pistachio shells, pomegranate hull and olive pulp as alternatives to wheat straw in sheep rations. Although the highest values in terms of milk yield were detected in the POM group, similar values were found in the other groups ( $P>0.05$ ). Cooper and Owen-Smith (1985) stated that feeds containing high levels of condensed tannin, such as POM, cause significant taste problems. However, at the end of the trial, it was observed that all of the adverse effects had been minimized, the performance values had approached each other, and there was no significant difference among the groups in terms of performance values, such as feed consumption and milk yield. On the other hand, adding POM to the ration at different rates can produce promising results in terms of milk yield.

Although there was no difference among the groups at the beginning of the trial and in the first month, the highest feed consumption was observed in the POM group. In contrast, the lowest feed consumption was observed in the CON group in the second month. The positive effects of POM and PIS used in the study on hay consumption are evident in Table 3. According to Villalba and Provenza (2000), if a low-quality feed is associated with a powerful nutrient, voluntary feed consumption of in sheep increases. Norouzian and Ghiasi (2012) showed in their study that the pistachio shell, which accounts for 30% of the roughage, had no adverse effects. Pistachio byproducts did not cause a significant change in performance values as well. Reed (1995) stated that POM, which contains high tannins, reduces feed consumption and protein digestibility due to its negative effect on digestion and



palatability. He also stated that high doses of the compounds in the POM could cause toxicity. In the present study, the positive effect on feed consumption and milk yield may be due to the increase in bypass protein in the rumen due to the tannin effect of the POM used in the study. In light of the data obtained, it was observed that OP, PIS, and POM added to the hay at a rate of 5% increased feed consumption, thus improving in the taste of the ration.

The highest fat content was determined in the PIS group in the second period, and the highest protein content was determined in the OP group in the third period (Table 3). The effect of diet on fat yield from sheep milk has been studied by many researchers (Angeles-Hernandez et al., 2020; Mohapatra et al., 2019). The fat content of milk increases with the addition of roughage and preserved oil used in the ration (Ergül et al., 2019). However, genetic, and nutritional interactions are influential in determining sheep milk protein. While milk protein synthesis, shaped under the control of many genetic mechanisms, is less affected by different ration practices, the nonprotein nitrogen fraction of milk is greatly affected by nutritional factors (Nudda et al., 2020). The findings obtained within the scope of the study are partially similar to this situation.

The lowest values in terms of somatic cell count (SCC) were obtained from POM and OP, and the lowest values in terms of urea amount were obtained from sheep in the PIS and POM groups (Table 3). Milk urea concentration is an indicator of protein metabolism associated with adverse effects on reproductive performance and immunity (Utama et al., 2018). At the end of the study, the SCC value tended to increase in all groups. This change in SCC value occurred under literature reports (Daş et al., 2022; Kahraman and Yüceer Özkul, 2020). Somatic cells consist of mammary epithelial cells, bacteria, and immune cells (Paschino et al., 2019). High SCC levels affect milk quality and indicate mammary gland inflammation (Podhorecká et al., 2021). The change in these parameters, which are used as primary indicators in evaluating of animal health, may be due to the bioactive components (flavonoids, polyphenols, anthocyanins, and tannins) in pistachio, pomegranate, and olive wastes. Because of these properties, PIS, POM, and OP can be recommended as measures to prevent increasing SCC values in the last period of lactation. The SCC values obtained from the study were within the acceptable range for healthy sheep milk (Daş et al., 2022; Kahraman and Yüceer Özkul, 2020).

Using pistachio byproducts at a dry matter ratio of approximately 50% in the diets of sheep does not affect blood metabolites (Ghasemi et al., 2012).

Similarly, Rezaeena et al. (2012) reported that using 15% PIS silage in the diet of early lactation dairy cows did not affect blood glucose and cholesterol. Gholizadeh et al. (2010) reported that no changes were observed in the concentration of blood metabolites (cholesterol, glucose, triglyceride, and blood urea nitrogen) in dairy cows when 10% pistachio shell was used in diets. In addition, it has been reported that the use of pistachio byproducts in the diet of sheep reduces blood urea nitrogen concentrations without affecting other blood metabolites (Ghaffari et al., 2014). Similar results have been reported for male calves in the growing period (Shakeri et al., 2013).

Oliveira et al. (2010) found that while the addition of different amounts of pomegranate extract to the ration of Holstein's calves did not affect the feed consumption and live weight gain of the calves in the first 30 days of age, the dry matter consumption and live weight gains of the calves decreased after 30 days of age in proportion to the increase in the amount of added pomegranate extract. Shabtay et al. (2008) stated that adding fresh pomegranate hull as a feed ingredient to the ration of Holstein Friesian fattening calves significantly increased feed consumption with live weight gain. Modarresi et al. (2010) reported that the addition of 6% or 12% pomegranate hull to the ration did not significantly affect the dry matter consumption and daily live weight gain of goats, but the milk yield decreased considerably with the increase in the level of pomegranate pulp added to the ration. In addition, it is stated that with the addition of 6% and 12% pomegranate pulp to the ration, the milk fat level increased by up to 8% and 15%, respectively, but the milk fat yield and milk protein level were not significantly affected. It was also determined that adding pomegranate hull to the ration did not affect blood glucose, cholesterol, urea, triglyceride, and lipoprotein levels.

Razzaghi et al. (2015) reported that pomegranate and pistachio byproducts did not affect milk yield, protein, and fat yield in dairy Saanen goats and positively changed the fat and protein ratio. Other studies have also reported the potential use of these byproducts as part of small ruminant diets (Abbeddou et al., 2011, Sedighi-Vasegh et al., 2015). Decreases in milk yield and milk protein content were observed in Awassi sheep fed with olive pomace-mixed rations (Abbeddou et al., 2015). The differences observed in milk yield and quality were because the rations were isoenergetic and not isonitrogenous (Abbeddou et al., 2011, Sedighi-Vasegh et al., 2015). It was determined that the PIS, POM, and OP used in the research did not harm the yield performance (feed intake, milk yield, and milk components) and health parameters of the

sheep. In addition, pistachio, pomegranate, and olive wastes used instead of straw in the research are valued as garbage. These fruit wastes constitute a significant environmental problem for the production enterprises. The use of these products, which are more valuable in terms of content (Table 1), although they have a lower economic value, can be evaluated to reduce feed costs.

## Conclusion

The present study reveals that the PIS, POM, and OP can be considered as alternative low-cost feed sources without causing a significant decline in milk yield and health parameters in sheep. Although this study demonstrates the biological potential of feed additives, large-scale studies with more significant numbers of individuals and groups are required to establish an actual cause-effect relationship.

## Conflict of Interest

The authors stated that they did not have any real, potential or perceived conflict of interest.

## Ethical Approval

This study was approved by the Harran University Animal Experiments Local Ethics Committee (04.02.2021, 2021/001/01 Number Ethics Committee Decision). In addition, the authors declared that Research and Publication Ethical rules were followed.

## Funding

This study supported by Minister of Industry and Technology, Southeastern Anatolia Project Regional Development Administration (Project no: 19323).

## Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 2% as stated in the report uploaded to the system.

## Author Contributions

Motivation / Concept: MK, ES, SY, MA, AD  
 Design: MK, ES, SY, MA, AD  
 Control/Supervision: MK, ES, SY, MA, AD  
 Data Collection and / or Processing: MK, AD, GG, BDD, AŞ, HY  
 Analysis and / or Interpretation: MK, HY, GG, BDD, AŞ, KT, BEA

Literature Review: MK, ES, SY, MA, AD  
 Writing the Article: MK, ES, SY, MA, AD  
 Critical Review: MK, ES, SY, MA, AD

## References

- Abbeddou S, Rischkowsky B, Hilali ME, Haylani M, Hess HD, Kreuzer M, 2015: Supplementing diets of Awassi ewes with olive cake and tomato pomace: on-farm recovery of effects on yield, composition and fatty acid profile of the milk. *Trop Anim Health Prod*, 47, 145-152.
- Abbeddou S, Rischkowsky B, Richter EK, Hess HD, Kreuzer M, 2011: Modification of milk fatty acid composition by feeding forages and agro-industrial byproducts from dry areas to Awassi sheep. *J Dairy Sci*, 94 (9), 4657-4668.
- Angeles-Hernandez JC, Alberto RV, Kebreab E, Appuhamy JARN, Dougherty HC, Castelan-Ortega O, Gonzalez-Ronquillo M, 2020: Effect of forage to concentrate ratio and fat supplementation on milk composition in dairy sheep: A meta-analysis. *Livest Sci*, 238, 104069.
- Daş A, Kahraman M, Güngören G, Daş BD, Boyraz MÜ, 2022: Milk yield and milk quality characteristics of Awassi sheep under semi-intensive conditions. *Adv VetBio Sci Tech*, 7 (1), 62-71.
- Caja G, Bocquier F, 2000: Effects of nutrition on the composition of sheep's milk. *Cah*, 52, 59-74.
- Cooper SM, Owen-Smith N, 1985: Condensed tannins deter feeding by browsing ruminants in a South African savanna. *Oecologia*, 67, 142-146.
- Ergül Ş, Ergül A, Göncü S, 2019: Süt Sığırlarında Besleme Stratejilerinin Süt Verimi ve Süt Kompozisyonu Üzerine Etkileri. *Int J East Mediterr Agric Res*, 2 (2), 145-165.
- Ghaffari MH, Tahmasbi AM, Khorvash M, Naserian AA, Ghaffari AH, Valizadeh H, 2014: Effects of pistachio by-products in replacement of alfalfa hay on populations of rumen bacteria involved in biohydrogenation and fermentative parameters in the rumen of sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 98 (3), 578-586.
- Ghasemi S, Naserian AA, Valizadeh R, Tahmasebi AM, Vakili AR, Behgar M, 2012: Effects of pistachio by-product in replacement of lucerne hay on microbial protein synthesis and fermentative parameters in the rumen of sheep. *Anim Prod Sci*, 52 (11), 1052-1057.
- Gholizadeh H, Naserian AA, Valizadeh R, Tahmasbi AM, 2010: Effect of feeding pistachio byproduct on performance and blood metabolites in Holstein dairy cows. *Int J Agric Biol*, 12 (6), 867-870.
- Inostroza K, Bravo S, Larama G, Saenz C, Sepúlveda N, 2020: Variation in Milk Composition and Fatty Acid Profile during the Lactation of Araucana Creole Ewes in a Pasture-Based System. *Animals*, 10 (1), 92.
- Kahraman M, Yüceer Özkul B, 2020: Milk yield and some milk quality traits of Akkaraman, Bafra and Bafra x Akkaraman F1 sheep. *Eurasian J Vet Sci*, 36 (2), 86-95.
- Kaufman EI, Asselstine VH, LeBlanc SJ, Duffield TF, DeVries TJ, 2018: Association of rumination time and health status with milk yield and composition in early-lactation dairy cows. *J Dairy Sci*, 101 (1), 462-471.

- Modarresi SJ, Fathi NM, Dayani O, Rashidi L, 2010: The effect of pomegranate seed pulp feeding on DMI, performance and blood metabolites of southern Khorasan crossbred goats. *Anim Sci Res*, 20-4 (2), 123-132.
- Mohapatra A, Shinde AK, Singh R, 2019: Sheep milk: A pertinent functional food. *Small Rumin Res*, 181, 6-11.
- Norouzian MA, Ghiasi SE, 2012: Carcass Performance And Meat Mineral Content In Balouchi Lamb Fed Pistachio By-Products. *Meat Sci*, 92, 157-159.
- Nudda A, Atzori AS, Correddu F, Battacone G, Lunesu MF, Cannas A, Pulina G, 2020: Effects of nutrition on main components of sheep milk. *Small Rumin Res*, 184, 106015.
- Oliveira RA, Narciso CD, Bisinotto RS, Perdomo MC, Ballou MA, Dreher M, Santos JEP, 2010: Effects of feeding polyphenols from pomegranate extract on health, growth, nutrient digestion, and immunocompetence of calves. *J Dairy Sci*, 93 (9), 4280-4291.
- Paschino P, Vacca GM, Dettori ML, Pazzola M, 2019: An approach for the estimation of somatic cells' effect in Sarda sheep milk based on the analysis of milk traits and coagulation properties. *Small Rumin Res*, 171, 77-81.
- Podhorecká K, Borková M, Šulc M, Seydlová R, Dragounová H, Švejcarová M, Peroutková J, Elich O, 2021: Somatic cell count in goat milk: an indirect quality indicator. *Foods*, 10 (5), 1046.
- Ramírez-Rivera EJ, Rodríguez-Miranda J, Huerta-Mora IR, Cárdenas-Cágal A, Juárez-Barrientos JM, 2019: Tropical milk production systems and milk quality: a review. *Trop Anim Health Prod*, 51 (6), 1295-1305.
- Razzaghi A, Naserian AA, Valizadeh R, Ebrahimi SH, Khorrami B, Malekshahi M, Khiaosa-ard R, 2015: Pomegranate seed pulp, pistachio hulls, and tomato pomace as replacement of wheat bran increased milk conjugated linoleic acid concentrations without adverse effects on ruminal fermentation and performance of Saanen dairy goats. *Anim Feed Sci Technol*, 210, 46-55.
- Reda FM, El-Saadony MT, El-Rayes TK, Attia AI, El-Sayed SA, Ahmed SY, Madkourf M, Alagawany M, 2021: Use of biological nano zinc as a feed additive in quail nutrition: biosynthesis, antimicrobial activity and its effect on growth, feed utilisation, blood metabolites and intestinal microbiota. *Ital J Anim Sci*, 20 (1), 324-335.
- Reed JD, 1995: Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J Anim Sci*, 73, 1516-1528.
- Rezaeena A, Naserian AA, Valizadeh R, Tahmasbi A, 2012: Effect of using different levels of pistachio by-products silage on composition and blood parameters of Holstein dairy cows. *Afr J Biotechnol*, 11 (22), 6192-6196.
- Sarıca Ş, 2011: Nar Suyu Yan Ürünlerinin Hayvan Beslemede Kullanım Olanakları. *JAFAG*, 28 (2), 97-101.
- Sedighi-Vesagh R, Naserian AA, Ghaffari MH, Petit HV, 2015: Effects of pistachio by-products on digestibility, milk production, milk fatty acid profile and blood metabolites in Saanen dairy goats. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 99 (4), 777-787.
- Shabtay A, Eitam H, Tadmor Y, Orlov A, Meir A, Weinberg P, Weinberg ZG, Chen Y, Brosh A, Izhaki I, Kerem Z, 2008: Nutritive and antioxidative potential of fresh and stored pomegranate industrial byproduct as a novel beef cattle feed. *J Agric Food Chem*, 56 (21), 10063-10070.
- Shakeri P, Riasi A, Alikhani M, Fazaeli H, Ghorbani GR, 2013: Effects of feeding pistachio by-products silage on growth performance, serum metabolites and urine characteristics in Holstein male calves. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 97 (6), 1022-1029.
- Tuik, 2015: Turkish Statistical Institute. Plant production statistics. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-Istatistikleri-2015>, Erişim tarihi; 21.05.2018.
- Tuik, 2018: Turkish Statistical Institute. Plant production statistics. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>, Erişim tarihi; 21.05.2018.
- Tzamaloukas O, Neofytou MC, Simitzis PE, 2021: Application of olive by-products in livestock with emphasis on small ruminants: Implications on rumen function, growth performance, milk and meat quality. *Animals*, 11 (2), 531.
- Utama S, Mulyati S, Wurlina W, Mustofa I, 2018: Effect of concentrate to forage ratio on milk urea nitrogen, milk production and reproductive performance of dairy cows. *Philipp J Vet Med*, 55, 25-34.
- Villalba JJ, Provenza FD, 2000: Postingestive feedback from starch influences the ingestive behaviour of sheep consuming wheat straw. *Appl Anim Behav Sci*, 66, 49-63.
- Xie Q, Xu Z, 2019: Sustainable agriculture: from sweet sorghum planting and ensiling to ruminant feeding. *Mol Plant*, 12 (5), 603-606.
- Yakan A, 2012: Koyun ve keçilerde süt verim kontrol yöntemleri ve laktasyon süt veriminin hesaplanması. *Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi*, 2, 18-23.

\*Correspondence: MÜCAHİT KAHRAMAN

Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Husbandry, Şanlıurfa, Turkey.  
e-mail: mucahitkahraman@harran.edu.tr

## Comparison of the Results of Automatic Blood Analyser and Manual Peripheral Smear Method in Total and Differential Leukocyte Count in Goats

Gülten Emek TUNA<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>University of Aydın Adnan Menderes, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Aydın, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-9729-8813

Geliş Tarihi: 01.04.2022

Kabul Tarihi: 11.05.2022

**Abstract:** The Abacus Vet 5 (AV5) is a volumetric impedance-based automated haematology analyser that offers a total and 3-part differential (lymphocytes, neutrophils and monocytes) white blood cell (WBC) count in goats. This study aimed to compare the total and differential leukocyte counts (absolute and relative) measured with the AV5 haematology analyser with the results obtained by the manual method from blood smears in goats. It is also aimed to compare the compatibility between the two methods. The blood samples of 40 hair goats (9 healthy and 31 diseased) were analysed by both methods. The relationships between the values were evaluated with a correlation coefficient, and the agreements between the methods were assessed with the Bland-Altman method. The correlation between two methods were excellent for total WBC counts ( $\rho = 0.963$ ,  $p = 0.000$ ), absolute neutrophils ( $\rho = 0.964$ ,  $p = 0.000$ ), lymphocytes ( $\rho = 0.928$ ,  $p = 0.000$ ), a good for the neutrophil percentages ( $\rho = 0.824$ ,  $p = 0.000$ ), and a weak for absolute monocytes ( $\rho = 0.426$ ,  $p = 0.006$ ). Although the bias for lymphocyte (-8.25 %) and neutrophil (10.02 %) percentages was relatively significant and the confidence intervals were wide, the agreement for all parameters was acceptable between the two methods in the Bland Altman method. In conclusion, the AV5 haematology analyser performed well for total, and differential WBCs counts in goats. However, abnormal results should still be confirmed by a blood smear examination. In addition, instrument performance evaluations, including increased sample sizes, should be performed in further studies.

**Keywords:** Blood smear, Goat, Haematology analyser, Manual method, White blood cell.

### Keçilerde Total ve Diferansiyel Lökosit Sayımlarında Otomatik Kan Analizörü ve Manuel Periferik Yayma Yöntemi Sonuçlarının Karşılaştırılması

**Özet:** Abacus Vet 5 (AV5), keçilerde toplam ve 3 parçalı diferansiyel (lenfositler, nötrofiller ve monositler) lökosit (WBC) sayısı sunan hacimsel empedans tabanlı otomatik bir hematoloji analizörüdür. Bu çalışmada, keçilerde AV5 hematoloji analizörü ile ölçülen toplam ve diferansiyel lökosit sayılarının (mutlak ve bağıl), kan yaymalarından manuel yöntemle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması amaçlandı. Ayrıca iki yöntemin uyumluluğunun karşılaştırılması da amaçlanmaktadır. Kırk kıl keçisinin (9 sağlıklı ve 31 hasta) kan örnekleri her iki yöntemle de analiz edildi. Değerler arasındaki ilişkiler korelasyon katsayısı ile, yöntemler arasındaki uyumlar ise Bland-Altman yöntemi ile değerlendirildi. İki yöntem arasındaki korelasyon, toplam WBC sayıları ( $\rho = 0.963$ ,  $p = 0.000$ ), mutlak nötrofiller ( $\rho = 0.964$ ,  $p = 0.000$ ) ve lenfositler ( $\rho = 0.928$ ,  $p = 0.000$ ) için çok iyi, nötrofil yüzdeleri için iyi ( $\rho = 0.824$ ,  $p = 0.000$ ) ve mutlak monositler için zayıftı ( $\rho = 0.426$ ,  $p = 0.006$ ). Lenfosit (% -8,25) ve nötrofil (%10,02) yüzdeleri için yanlış göreceli olarak önemli ve güven aralıkları geniş olmasına rağmen, Bland-Altman yönteminde iki yöntem arasında tüm parametreler için uyum kabul edilebilirdi. Sonuç olarak, AV5 hematoloji analizörü keçilerde toplam ve diferansiyel WBC sayıları için iyi performans göstermiştir. Bununla birlikte, anormal sonuçlar yine de bir kan frotisi incelemesi ile doğrulanmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Hematoloji analiz cihazı, Kan frotisi, Keçi, Lökosit, Manuel yöntem.

### Introduction

The complete blood count (CBC) is a fast, inexpensive diagnostic test that helps the responsible veterinarian with various problems. Getting the results fast provides a significant advantage to both physicians and patients. CBC provides a rapid assessment of quantitative and qualitative changes in different blood cells (e.g., erythrocytes, leukocytes and platelets) (Mehain et al., 2019; Rejec et al., 2017). From these blood cells, leukocytes (WBC) (total and differential) are widely used in the clinical process to determine the

inflammatory response (Willard and Tvedten, 2012). This relationship between WBC and inflammatory response makes the number of WBCs an important measurement for diagnosing and prognosis of various diseases (Chung et al., 2015). WBC is a group of heterogeneous nucleated cells that can circulate at least once in their lifetime, including neutrophils, eosinophils, basophils, lymphocytes and monocytes. The average WBC count in healthy goats ranges from 4 to  $13 \times 10^3/\mu\text{L}$  (Weiss and Wardrop, 2010). The differential count by cell type

is more important than the total WBC count because increases and decreases in individual cell types can co-occur, and the total WBC count may remain unchanged (Jones and Allison, 2007).

The leukocyte count can be performed with automatic devices or manually. Automated methods can count large numbers of cells to provide a statistically more accurate reading of the WBC count. The most important feature of these devices is that they give results quickly compared to manual methods and minimise the number of smears to be examined. Therefore, various brands and models of devices are widely used in human and veterinary medicine. However, it is expensive because it requires special equipment (Stirn et al., 2014). These devices measure according to the number of cells, size, surface area, and properties such as granules inside. Because of these features, they may sometimes not be able to distinguish normal cells from abnormal ones and may cause erroneous counts in case of abnormal cells (Platelet aggregates, giant platelets, normoblasts, erythrocytes resistant to lytic solutions) are present (Putzu and Di Ruberto, 2013). The cells should be checked by doing a peripheral smear to confirm the results of the device and identify morphological abnormalities (Jones and Alison, 2007).

Therefore, this study aimed to compare the total and differential leukocyte counts (absolute and relative) measured with the AV5 haematology analyser with the results obtained by the manual method from blood smears in goats. It is also aimed to compare the compatibility between the two methods.

## Materials and Methods

The Animal Research Ethics Committee approved the study of the Aydın Adnan Menders University under protocol number 64583101/2022/016.

The animal material of the study consisted of 40 hair goats of different ages and genders, which were brought to Adnan Menderes University Veterinary Faculty Research Hospital and various veterinary clinics in Aydın for examination, treatment and control. Five millilitres of blood samples were taken from *vena jugularis* into tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for laboratory examinations from goats. Total and differential (absolute and relative) leukocytes (neutrophils, lymphocytes and monocytes) counts were determined by performing CBC with the Abacus Vet 5 Hematology Device (AV5) (Abacus Vet, Diatron MI LTD, Hungary) within 4 hours from the blood samples taken. The device used the volumetric impedance method, which counts cells

according to their properties, such as size and surface area. Also, at least two Wright-Giemsa stained blood smears were prepared for each goat to determine manually the total and differential WBC counts using the method reported by Vives Corrons et al. (2004). Olympus CX21 microscope was used for the manual method. The WBC counts per area in 20 fields ( $\times 40$  objective) in a monolayer of the smear were calculated and averaged. The estimated WBC counts were determined by multiplying the obtained value by 1500 (Bellwood and Andrasik-Catton, 2014; Petanides et al., 2004). The recommended correction factor of 100 to 150 for a  $\times 100$  magnification on several blood films was used to determine WBCs accurately (Harvey, 2001; Katsogiannou et al., 2019). A microscope with an  $\times 100$  objective lens was used for the differential count of WBCs. The morphology of 200 WBCs were carefully evaluated for the manual differential in each blood smear. Neutrophil, lymphocyte, and monocyte counts were determined using the battlement method. Relative (%) and absolute numbers ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) of cells were then calculated. Two different observers evaluated the same blood smears independently, and the average of the two evaluations was used in the study. Samples with inappropriately filled tubes and poor-quality blood smears were excluded from the study.

All statistical analyses were performed using the software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 19.0 (IBM Corporation, Armonk, USA) and GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc. San Diego, USA). The distribution of numerical data was checked with Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. Student T-test was used to compare the normally distributed parameters, and A Mann-Whitney test was used to compare non-normally distributed parameters. The relationships between the values were evaluated with the Pearson correlation coefficient (for normal distribution data) or Spearman's correlation coefficient (for non-normal distribution data). An agreement between the methods was assessed with the Bland-Altman method (Bland and Altman, 1986), and the manual method for WBC differentials was taken as the reference method.  $P < 0.05$  was considered significant in all evaluations.

## Results

Forty Turkish hair goats of different ages (1-3 years old) and gender were enrolled in this study. Nine goats were healthy, and 31 goats were diseased. Nine goats were deemed healthy based on history, clinical examination and laboratory results. All 31 goats showed varying pneumonia signs, and various parasites were found in their

**Table 1.** Descriptive statistics and statistical differences of haematological parameters measured with the manual method and the AV5 haematology device.

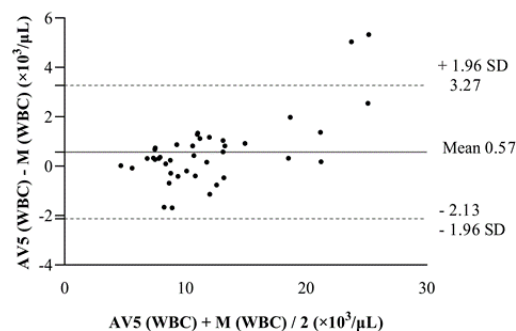
Parameters	Method	Mean± SD	Median (IQR)	Min-Max	p
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	M	11.67 ± 4.84	10.35 (8.41-12.95)	4.65-23.85	0.004
	AV5	12.24 ± 5.77	10.98 (8.07-13.58)	4.67-27.86	
Lymphocytes ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	M	6.61 ± 3.37	5.86 (4.21-7.21)	2.34-15.57	0.000
	AV5	5.71 ± 3.02	4.77 (3.54-6.46)	2.18-14.21	
Lymphocytes (%)	M	56.09 ± 11.35	57 (50.00-65.75)	26-76	0.002
	AV5	46.82 ± 11.46	47.40 (40.92-54.93)	18.00-66.80	
Monocytes ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	M	0.09 ± 0.08	0.08 (0.04-0.11)	0-0.33	0.866
	AV5	0.11 ± 0.08	0.09 (0.05-0.13)	0.02-0.44	
Monocytes (%)	M	0.76 ± 0.47	1 (0.5-1)	0-2.07	0.869
	AV5	0.85 ± 0.43	0.7 (0.6-0.9)	0.5-2.80	
Neutrophils ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	M	5.30 ± 3.33	4.41 (2.88-6.29)	1.44-17.27	0.000
	AV5	6.39 ± 3.59	5.30 (3.97-7.68)	1.96-17.34	
Neutrophils (%)	M	42.25 ± 12.22	41.25 (33-48)	25-73.50	0.000
	AV5	52.27 ± 11.52	51.95 (44.35-58.53)	32.70-80.20	

**Abbreviations:** AV5, Abacus Vet 5; IQR, interquartile range; M, Manuel method; Min.-Max., minimum-maximum;SD, standard deviation; WBC, White blood cell.

stool. When evaluated by both methods, ten goats had leukocytosis, and the leukocyte values of 21 goats were within the reference ranges.

Descriptive statistics and statistical differences of haematological parameters measured with the manual method and the AV5 haematology device are shown in Table 1. WBC, absolute neutrophil count and neutrophil percentage measured on the automated analyser were significantly higher than in the manual method. In contrast, absolute lymphocyte counts and lymphocyte percentages were significantly higher in the manual method ( $p > 0.05$ ) (Table 1). There were no statistical differences in the monocytes (absolute and relative) between methods ( $p > 0.05$ ). Comparing the manual method and the AV5 automated analyzer results, an excellent correlation was determined for WBC count ( $\rho = 0.963$ ,  $p = 0.000$ ), absolute neutrophil ( $\rho = 0.964$ ,  $p = 0.000$ ) and lymphocyte count ( $\rho = 0.928$ ,  $p = 0.000$ ), a good correlation for the neutrophil percentages ( $\rho = 0.824$ ,  $p = 0.000$ ), and a weak correlation for absolute monocyte count ( $\rho = 0.426$ ,  $p = 0.006$ ). There was no significant relationship between the lymphocyte ( $\rho = -0.039$ ,  $p > 0.05$ ) and monocyte percentages ( $\rho = 0.063$ ,  $p > 0.05$ ) between the methods. The Bland-Altman plots are presented in Figure 1 and Figure 2. Although low bias was determined in the WBC, neutrophils, lymphocytes, monocytes and monocytes percentages, the bias was relatively high in the percentage of lymphocytes and neutrophils. In addition, 95% of the differences between the measurement values of the parameters evaluated by the two methods were within the limits of

agreement (LOAs). However, LOAs for the percentage of lymphocytes and neutrophils were relatively wide.

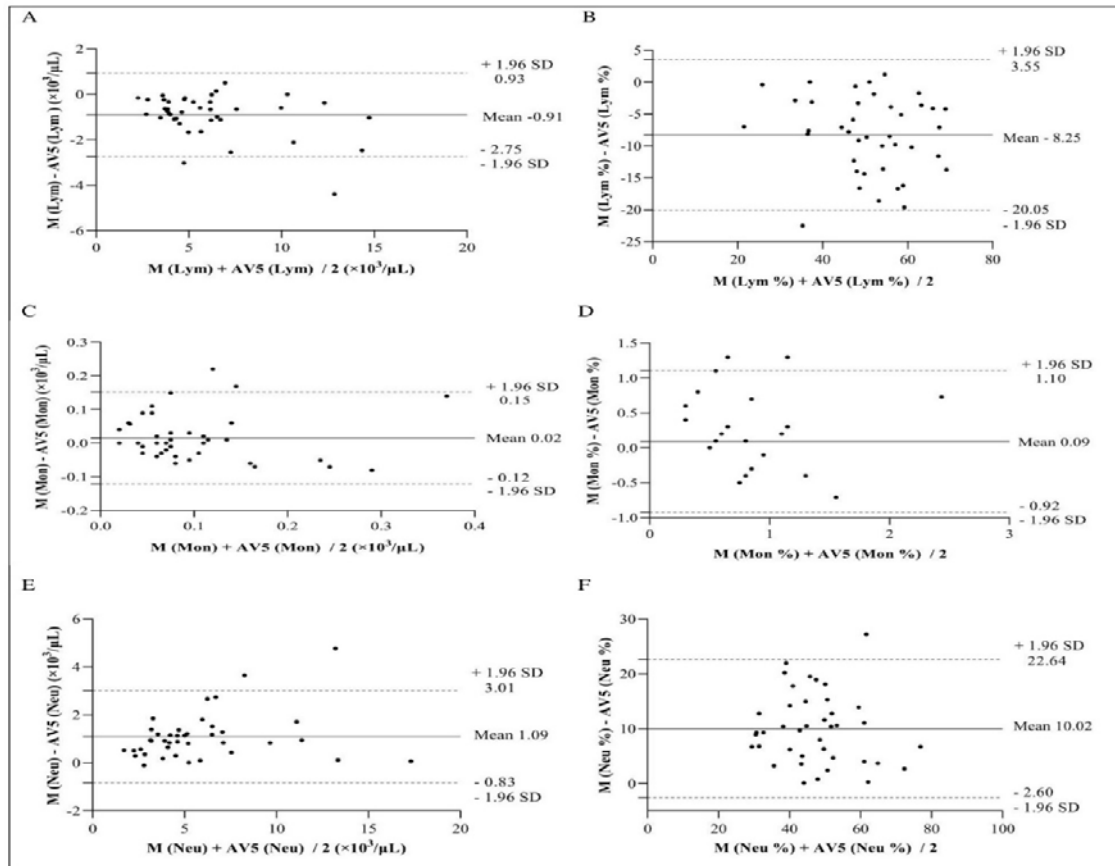


**Figure 1.** Comparison of WBC obtained from the two methods by Bland-Altman analysis. The solid dark line indicated the bias (mean difference), and dashed dark lines represent the 95% confidence intervals of the bias.

**Abbreviations:** AV5, Abacus Vet 5; M, Manuel method; SD, standard deviation; WBC, White blood cell.

## Discussion and Conclusion

Goats are ruminants that are easy to care for and feed and provide income to their breeders with milk, meat, lint and hair. Better use of bush, rocky and mountainous areas also puts goats in a different place among farm animals. Due to all these features, the interest in goat breeding in animal production increases day by day. In parallel with this increase, an increase is observed in the number of goats brought to veterinary clinics due to



**Figure 2.** Comparison of lymphocyte counts (A), lymphocyte percentages (B), monocyte counts (C), monocyte percentages (D), neutrophil counts (E), neutrophil percentages (F) obtained from the two methods by Bland-Altman analysis. The solid dark line indicated the bias (mean difference), and dashed dark lines represent the 95% confidence intervals of the bias.

**Abbreviations:** AV5, Abacus Vet 5; Lym, lymphocyte; M, Manuel method; Mon, monocyte; SD, standard deviation; Neu, neutrophil.

health problems. In ruminants, laboratory evaluation of the CBC is an important extension of the physical examination and has become an important tool in approaching medical cases (Jones and Alison, 2007; Oikonomidis et al., 2020). It can identify certain disease processes and monitor and evaluate animals' health and welfare status. Also, it is beneficial for predicting prognosis. The Abacus Vet 5 is an automated haematology analyser that offers a total and 3-part differential (lymphocytes, neutrophils and monocytes) WBC results on goats. It is widely used in veterinary clinics and hospitals in our country. Therefore, this study aimed to evaluate the effectiveness and agreement of the AV5 automatic analyser compared to the manual method. This is the first study to characterise the analytical performance of the automated analyser for WBC (total and differentiated) measurement in goats.

The agreement of the measurements of the newly developed device with the reference (standard) method is evaluated by method comparison. According to the evaluation result,

whether the new device is usable or not can be assessed. For this purpose, comparison of the mean or median of the new (test) and reference method, correlation analysis, linear, Passing Bablok or Deming regression, and Bland-Altman method are statistical methods that are frequently used in determining the agreement between measurement techniques (Giavarina, 2015; Özen, 2018; Van Stralen et al., 2008).

Comparing the mean/median of two methods (new/test-reference) shows the general trend of increasing or decreasing values rather than reflecting the actual difference between them (Bland and Altman, 1986). This statistical method reveals a non-proportional but constant difference between two sets of measurements (Giavarina, 2015). There was a significant difference between WBCs and differentials (absolute and relative) measured with the AV5 automatic analyser and the manual method (Table 1). The automated analyser generated significantly higher WBC, absolute neutrophil count, and neutrophil percentage than the manual method. In contrast, absolute

lymphocyte counts and lymphocyte percentages were significantly higher in the manual method (Table 1). This difference between the two methods can be interpreted as a general trend of increasing or decreasing values rather than inconsistency. This statistical method reveals a disproportionate but constant difference between the two measurement groups (Megahed et al., 2019; Simundic, 2012). The difference between the two methods for WBC counting was an expected result because reference methods such as hemocytometer were not used for WBC counting in this study; only the estimated WBC count and automatic blood count results were compared. Although the manual method is considered the reference method for studies confirming WBC differentials, it is also characterised by significant variability (Oikonomidis et al., 2020). Also, automated devices may not distinguish normal cells from abnormal ones due to abnormal cells, resulting in erroneous results (Putzu and Di Ruberto, 2013). These situations can explain differences in lymphocytes (absolute and relative) and neutrophils (absolute and relative).

The WBC analyses of goats samples for the total and 3-part differential showed good to excellent correlations for WBC count ( $\rho = 0.963$ ,  $p = 0.000$ ), absolute neutrophil ( $\rho = 0.964$ ,  $p = 0.000$ ), absolute lymphocyte ( $\rho = 0.928$ ,  $p = 0.000$ ) and neutrophil percentages ( $\rho = 0.824$ ,  $p = 0.000$ ). Moreover, there was a weak correlation in absolute monocyte ( $\rho = 0.426$ ,  $p = 0.006$ ), while no significant correlation was found in the lymphocyte ( $\rho = -0.039$ ,  $p > 0.05$ ) and monocyte percentages ( $\rho = 0.063$ ,  $p > 0.05$ ). Although correlation coefficients are frequently used to determine the agreement between the two methods, it is also known that this test has potential disadvantages (Giavarina, 2015; Van Stralen et al., 2008). The correlation coefficient primarily depends on the distribution width of the data. Since the total and differential WBC counts were measured in healthy and diseased goats in this study, the parameters covered a wide range of values (Table 1). The wide distribution of the data can explain the excellent to good positive correlations between the values measured by the two methods (Van Stralen et al., 2008). The correlation coefficient can describe the linear relationship between two different data sets; however, it cannot detect whether there is a constant or proportional difference between the two methods (Van Stralen et al., 2008). Therefore, this situation should not mean that the two methods agree. They also report that although the two methods are weakly agreement, they can show high correlation (Bland and Altman, 1986; Chhapola et al., 2015; Jensen and Kjelgaard-Hansen, 2006).

It is emphasised that the Bland and Altman method should be used in determining the agreement of the two methods due to the comparison of mean/median values and various disadvantages of correlation analysis (Giavarina, 2015; Jensen and Kjelgaard-Hansen, 2006; Özen, 2018). The Bland-Altman plots revealed a low bias for WBC (Figure 1), lymphocyte, neutrophil, monocyte and percentage monocyte (Figure 2). The fact that the bias of WBC, lymphocyte, neutrophil, monocyte and percentage monocyte are small and the agreement limits are acceptable shows that the agreement between the two methods for these five parameters are good. However, significant negative (-8.25) and positive (10.02) biases were determined for lymphocyte and neutrophil percentages, respectively (Figure 2). The AV5 haematology device works on the volumetric impedance principle and identifies cells according to their size and surface area. Goats primarily have small and medium-sized lymphocytes (Jones and Alison, 2007). However, small ruminant blood smears may typically contain a low number of large lymphocytes (Oikonomidis et al., 2020). An increased number of large lymphocytes, platelet aggregations, giant platelets and normoblasts may be misclassified by automated devices, affecting the percentage of neutrophils and lymphocytes (Oikonomidis et al., 2020). It should also not be forgotten that the manual method, which is the reference method, is also characterised by significant variability (Rümke, 1977). These conditions can explain the considerable biases between the two methods in lymphocyte and neutrophil percentages. Although significant bias was detected for both parameters and the 95% agreement limits were moderately wide, 95% of the differences between the measurement values of lymphocyte and neutrophil percentages were within LOAs. The Bland-Altman analysis objectively reveals the measurement differences between the two methods. It leaves the interpretation of the acceptability level of the differences to the clinician's opinion (Jensen ve Kjelgaard-Hansen, 2006). Given that the reference ranges for lymphocyte (50-70 %) and neutrophil percentages (30-48 %) in goats were relatively wide and the absolute values of both parameters agreed between methods, this bias was unlikely to affect clinical interpretations. Thus, it was assumed that the agreement between the two methods was also acceptable for these parameters.

There are several limitations to this study. First, the recommended reference method in goats was not used for the total leukocyte count. The agreement between the estimated WBC counts obtained from the peripheral smear and the WBC counts obtained from the automated device was



compared. Second, CBCs were not performed in duplicate as ideally recommended in the ASVCP guidelines (Arnold et al., 2019) for method comparison. Third, the agreements of total and differential WBCs of sick and healthy goats were evaluated together and were not assessed separately. Finally, the sample count was the minimum recommended for method comparisons (Bilic-Zulle, 2011; Jensen & Kjølgaard-Hansen, 2006; Westgard, 2010). A larger number of animals could have increased the power of the tests.

In conclusion, the Abacus Vet 5 haematology analyser appears to perform well for total and differential WBCs compared with the manual method, and it can be used safely for routine laboratory examinations in goats. However, there is a high probability of numerical and morphological abnormalities in total and differential WBCs of sick goats. Therefore, the abnormal results should always be confirmed with a blood smear examination. In addition, the precision, accuracy and instrument performance evaluations, including increased sample sizes, should be performed in further studies.

### Acknowledgement

We would like to thank Aleyna DEMİRCİ for their support in this study.

### Conflict of Interest

The author stated that they did not have any real, potential or perceived conflict of interest.

### Ethical Approval

This study was approved by the xAydın Adnan Menderes University Animal Experiments Local Ethics Committee (64583101/2022/016 Number Ethics Committee Decision). In addition, the authors declared that Research and Publication Ethical rules were followed.

### Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 8% as stated in the report uploaded to the system.

### Author Contributions

Motivation / concept: GET  
Design: GET  
Control/supervision: GET  
Data collection and/or processing: GET

Analysis and/or Interpretation: GET

Literature review: GET

Writing the article: GET

Critical review: GET

### References

- Arnold JE, Camus MS, Freeman KP, Giori L, Hooijberg EH, Jeffery U, Korchia J, Meindel MJ, Moore AR, Sisson SC, Vap LM, Cook JR, 2019: ASVCP guidelines: principles of quality assurance and standards for Veterinary Clinical Pathology (version 3.0). *Vet Clin Pathol*, 48 (4), 542-18.
- Bellwood B, Andrasik-Catton M, 2013: Veterinary Technician's Handbook of Laboratory Procedures. 1st ed., Wiley-Blackwell Publishing, New York, USA.
- Bilić-Zulle L, 2011: Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Med*, 21 (1), 49-52.
- Bland JM, Altman DG, 1986: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1 (8476), 307-310.
- Chhapola V, Kanwal SK, Brar R, 2015: Reporting standards for Bland-Altman agreement analysis in laboratory research: a cross-sectional survey of current practice. *Ann Clin Biochem*, 52 (3), 382-6.
- Chung J, Ou X, Kulkarni RP, Yang C, 2015: Counting White Blood Cells from a Blood Smear Using Fourier Ptychographic Microscopy. *PLoS One*, 10 (7), e0133489.
- Giavarina D, 2015: Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med*, 25 (2), 141-51.
- Harvey J (2001). Leukocyte evaluation In: Atlas of Veterinary Hematology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals. Harvey J (Ed), 24-26, Saunders Company, Philadelphia.
- Kjølgaard-Hansen M, Jensen AL, 2006: Is the inherent imprecision of manual leukocyte differential counts acceptable for quantitative purposes? *Vet Clin Pathol*, 35 (3), 268-270.
- Jones ML, Allison RW 2007: Evaluation of the ruminant complete blood cell count. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 23 (3), 377-402.
- Katsogiannou EG, Athanasiou LV, Katsoulos PD, Polizopoulou ZS, Tzivara A, Christodouloupoulos G, 2020: Estimation of white blood cell and platelet counts in ovine blood smears, and a comparison with the ADVIA 120 hematology analyser. *Vet Clin Pathol*, 49, 222-226.
- Megahed AA, Hiew MWH, Grünberg W, Constable PD, 2016: Evaluation of 2 portable ion-selective electrode meters for determining whole blood, plasma, urine, milk, and abomasal fluid potassium concentrations in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 99 (9), 7330-7343.
- Mehain SO, Haines JM, Lee PM, 2019: Platelet indices as biomarkers for characterisation and determination of severity in canine chronic enteropathy. *Vet J*, 248, 37-41.
- Oikonomidis IL, Brozos C, Kiossis E, Tsouloufi TK, Kritsepi-Konstantinou M, 2021: A comparison study between the results of the Siemens ADVIA 120 analyser and

- the manual method for differential leukocyte counts in sheep. *Vet Clin Pathol*, 50, 203-208.
- Özen D, 2018: Ölçüm teknikleri arasındaki uyumun belirlenmesinde kullanılan grafiksel yöntemlerin ve regresyon modellerinin bir uygulama ile incelenmesi. *Eurasian J Vet Sci*, 34 (4), 265-271.
- Petanides TA, Mylonakis ME, Koutinas AF, 2004: Evaluating the leukogram in the dog and cat. *J Hellenic Vet Med Soc*, 55, 130-135.
- Putzu L, Di Ruberto C, 2013: White blood cells identification and counting from microscopic blood image. *Int. J. Pharm. Biomed. Res*, 7 (1), 15-22.
- Rejec A, Butinar J, Gawor J, Petelin M, 2017: Evaluation of Complete Blood Count Indices (NLR, PLR, MPV/PLT, and PLCRi) in Healthy Dogs, Dogs With Periodontitis, and Dogs With Oropharyngeal Tumors as Potential Biomarkers of Systemic Inflammatory Response. *J Vet Dent*, 34 (4), 231-240.
- Rümke SL, 1977: The statistically expected variability in differential leukocyte counting. In: *Differential Leukocyte Counting*, Koepke JA (Ed), 39-45, College of American Pathologists, Aspen, USA.
- Simundic AM, 2012: Practical recommendations for statistical analysis and data presentation in *Biochemia Medica* journal. *Biochem. Med*, 22 (1), 15-23.
- Stirn M, Moritz A, Bauer N, 2014: Rate of manual leukocyte differentials in dog, cat and horse blood samples using ADVIA 120 cytograms. *BMC Vet Res*, 10, 125.
- Van Stralen KJ, Jager KJ, Zoccali C, Dekker FW, 2008: Agreement between methods. *Kidney Int*, 74 (9), 1116-1120.
- Vives Corróns JL, Albarède S, Flandrin G, Heller S, Horvath K, Houwen B, Nordin G, Sarkani E, Skitek M, Van Blerk M, Libeer JC, 2004: Haematology Working Group of the European External Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine. Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: Control material. *Clin Chem Lab Med*, 42 (8), 922-6.
- Weiss DJ, Wardrop KJ, 2010: *Schalm's Veterinary Hematology*, 6th ed., Wiley-Blackwell Publishing, New York, USA.
- Westgard JO, 2010: *The Comparison of Methods Experiment*. <http://www.westgard.com/lesson23.htm#10>, Erişim tarihi; 18.11.2019.
- Willard DM, Tvedten H, 2012: *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. 5th ed., Elsevier, USA.

\*Yazışma Adresi: Gülten Emek TUNA

University of Aydın Adnan Menderes, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Aydın, Turkey

e-mail: emektuna@adu.edu.tr

## Şanlıurfa Bölgesinde Sığırlarda Paratüberküloz Seroprevalansının Belirlenmesi

Ali ÇELİK<sup>1,a</sup>, Osman Yaşar TEL<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Haliliye Tarım ve Orman İlçe Müdürlüğü, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-2854-4988, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0001-7848-3899

Geliş Tarihi: 13.04.2022

Kabul Tarihi: 29.05.2022

**Özet:** Bu çalışmada, önemli ekonomik kayıplara neden olan kronik enfeksiyöz bir hastalık olan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) tarafından oluşturulan paratüberküloz'un Şanlıurfa'daki sığırlarda seroprevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, tesadüfi örnekleme ile Şanlıurfa merkez ilçelerinden, sağlıklı 465 sığırdan alınan serumlar kullanıldı. Serum örneklerinden anti-MAP antikorlarını tespit etmek amacıyla ELISA kullanılmıştır. İncelenen 465 serumun 21 (%4,51)'i pozitif, 16 (%3,4)'ü şüpheli ve 428 (%92)'i negatif bulundu. Bu çalışmada, MAP'a karşı antikorların saptanması bölgede hastalığın var olduğunu ve bölgemizde hem ekonomik kayıp oluşturması nedeniyle hem de hayvan refahı için paratüberküloz'a karşı koruma ve kontrol önlemlerinin alınmasının gerekliliği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** ELISA, Paratüberküloz, Sığır, Seroprevalans, Şanlıurfa.

### Seroprevalence of Paratuberculosis in Cattle in Sanliurfa Region

**Abstract:** This study aimed to determine the seroprevalence of paratuberculosis caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), a chronic infectious disease that causes significant economic losses, in cattle in Sanliurfa. For this purpose, sera from randomly selected 465 healthy cattle were used in the Central Districts of Sanliurfa Province. ELISA was used to detect paratuberculosis (MAP) IgG antibodies. As a result of the test, 21 (4.51%) out of 465 sera gave a positive reaction. Sixteen sera (3.4%) gave doubtful results, and 428 (92%) sera were negative. In the study, antibodies were detected against MAP, indicating the presence of the disease in the region. Therefore, it was concluded that it was essential to reveal the prevalence of the disease in our country, and related prevention measures should be taken against Paratuberculosis (MAP).

**Keywords:** Cattle, ELISA, Paratuberculosis, Seroprevalence, Sanliurfa.

### Giriş

Paratüberküloz (Johne Hastalığı) yabani ve evcil ruminantların sindirim sistemini etkileyen ve süt ineği yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan kronik enfeksiyöz bir hastalıktır. Enfeksiyon sindirim sisteminde granulatöz yangıya neden olarak, hayvan kademeli olarak zayıflamasına ve sonrasında ölüme neden olmaktadır (Alaçam ve ark. 1997).

Paratüberkülozun tanısında kültür altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak hastalığın başlangıç evrelerinde etkenin dışkı ile çıkarılmaması veya aralıklı olarak çıkarılması ve kültür protokollerinin yetersiz kalması enfekte hayvanların tespitinde kültür yönteminin her zaman doğru sonuç vermemesine neden olmaktadır (Ayele ve ark., 2001; Gilardoni ve ark. 2012). Bu nedenle paratüberkülozun teşhisinde moleküler (PCR, Real Time-PCR vb), serolojik [enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA), komplement fizyasyon testi (KFT), agar jel immuno difüzyon vb] ve hücrel (alerjik deri testi, gama interferon testi gibi) yöntemler ile histopatolojik metodlardan yararlanılmaktadır (Ayele ve ark., 2001; Harris ve

Barletta, 2001; OIE, 2013; Quinn ve ark., 2005). PCR tekniklerinin pahalı olması, kontaminasyon riskinden kaynaklanan yanlış pozitif sonuçlar ve PCR inhibitörlerinden kaynaklanan yanlış negatif sonuçlar gibi bazı dezavantajları bildirilmiştir (Güner, 2004; Irenge ve ark., 2009; Moravkova ve ark., 2008).

Paratüberkülozun teşhisinde MAP'a karşı gelişen antikorların varlığını ortaya koymak amacıyla ELISA, agar jel immuno difüzyon, komplement fizyasyon, gibi serolojik testlerden yararlanılmaktadır (Ayele ve ark., 2001; Coelho ve ark., 2007; Quinn ve ark., 2005). Serolojik testler içinde ELISA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)'e karşı oluşan antikorların kan serumunda belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. ELISA tekni diğer serolojik testlere göre ucuz, kolay ve tekrarlanabilir olması, çok sayıda örneğin birlikte değerlendirilebilmesi, sonuçların objektif yorumlanabilmesi gibi avantajlara sahiptir (Gilardoni ve ark., 2012).

Bu çalışmada, süt inekçiliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan paratüberkülozun

Şanlıurfa'da seroprevalansının ELISA ile araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Serumların Toplanması:** Bu çalışma için Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulundan (Harran Üniversitesi-HADYEK) 09/10/2019-E.43310 numara ile izin alınmıştır.

Bu çalışmada 2018-2020 yılları arasında Şanlıurfa merkez ilçelerinden 27 işletmeden Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine gelen tesadüfi olarak seçilen toplam 465 adet sığır serumu çalışmanın materyalini oluşturdu. Serum örnekleri, 2 yaşından büyük, paratüberküloz yönünden aşılanmamış hayvanlardan alındı.

Kan örnekleri Vena jugularis'ten antikoagülansız jelli tüplere alınarak 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve çalışma yapıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

**ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay):** Serum örneklerinden paratüberküloz anti-MAP antikorların belirlenmesi için ticari ELISA kiti (IDEXX Paratuberculosis Screening Ab Test, Netherlands) kullanılmıştır.

Test prosedürü üretici firmanın belirttiği şekilde yapılmıştır. Kısaca, serum örnekleri, pozitif ve negatif kontrollerden mikropleyt kuyucuklarına, 100 µl olacak şekilde konularak, 18-26 °C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra mikropleytlar 4 kez 300 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı ve tüm kuyucuklara 100 µl konjugat konuldu. Mikropleyt plastik filmle örtülüp 30 dakika boyunca oda ısısında inkübasyona

birakıldı. Süre bitiminde 3 kez 300 µl yıkama sıvısı kullanılarak yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra, bütün kuyucuklara 100 µl TMB substrat konuldu. Sonrasında mikropleyt plastik filmle örtülüp oda ısısında 10 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı ve her kuyucuğa 100 µl kullanıma hazır stop solüsyonu eklenerek, 450 nm'de kuyucukların absorbans değerleri ELISA Reader (Biobase EL10A) ile ölçüldü. Sonuçlar ELISA kitinde bildirildiği şekilde değerlendirildi.

**İstatistiksel analiz:** Verilerin istatistiksel analizinde gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesine göre SPSS 15.0 paket programı ile ki-kare testi kullanılarak yapıldı.

## Bulgular

Çalışmada örneklerinin ELISA ile incelenmesi sonucunda 21 (%4.51) örnek anti-MAP antikorları yönünden pozitif bulunurken; 16 (%3,4) örnekte şüpheli bulunmuştur. 428 (%92) serum örneği ise negatif bulunmuştur. Bu çalışmada kan örneklerinin alındığı yerleşim yerlerine göre pozitiflik oranı, Haliliye ilçesinde %0.4 Eyyübiye ilçesinde %12.6 olduğu saptanırken Karaköprü ilçesinde seropozitiflik saptanmamıştır (Tablo 1). Seropozitiflik oranları ile yerleşim yerleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulundu (P<0,000). Ayrıca, çalışmada toplam 25 farklı işletmeden örnekleme yapılmıştır. İki ilçede pozitif sonuç veren hayvanlar bazında, Şanlıurfa yöresi için sürü prevalansı %16 olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 1.** Yerleşim yerlerine göre paratüberkülozun seroprevalansı.

Yerleşim yeri	İncelenen serum sayısı n (%)	Pozitif serum sayısı n (%)	Şüpheli serum sayısı n (%)	Negatif serum sayısı n (%)
Haliliye	207 (44,5)	1 (0,48)	1 (0,48)	205 (99,03)
Eyyübiye	158 (33,97)	20 (12,65)	15 (9,49)	123 (77,84)
Karaköprü	100 (21,52)	-	-	100 (100)
<b>Toplam</b>	<b>465 (100)</b>	<b>21 (4,51)</b>	<b>16 (3,44)</b>	<b>428 (92,04)</b>

**Tablo 2.** Sığır ırklarına paratüberkülozun seroprevalansı.

Hayvan ırkı	Pozitif n (%)	Negatif n (%)	Şüpheli n (%)
1. Holstein (n: 321)	16 (%4,98)	292 (%90,96)	13 (%4,04)
2. Simental (n:144)	5 (%3,47)	136 (%94,44)	3 (%2,08)
<b>Toplam (n: 465)</b>	<b>21 (%4,51)</b>	<b>428 (%92,04)</b>	<b>16 (%3,44)</b>

n; Hayvan sayısı

Tablo 3. Sığır yaşına göre paratüberkülozun dağılımı.

Hayvan	2-3 yaş			3-4 yaş			4-5 yaş			5 yaş üzeri		
	P	N	Ş	P	N	Ş	P	N	Ş	P	N	Ş
Sığır	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
	4	43	0	5	69	1	0	116	11	12	116	4
	(%8,51)	(%93,61)	(%0)	(%6,66)	(%92)	(%1,33)	(%0)	(%91,33)	(%8,66)	(%9,09)	(%87,87)	(%3,03)

n; Hayvan sayısı, P; Pozitif hayvan sayısı, N; Negatif hayvan sayısı, Ş; Şüpheli hayvan sayısı

Bu çalışmada Holstein ve Simental ırkı sığırlarda seropozitiflik oranı sırasıyla %4,98 ve % 3.47 olarak belirlenmiştir (Tablo 2). Çalışmada belirlenen seropozitiflik oranları ırk yönünden değerlendirildiğinde istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (P=0.267).

Seropozitiflik oranları yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde 2-3 yaş aralığındaki sığırlarda %8.5 (n=4), 3-4 yaş aralığındaki sığırlarda %6.7 (n=5) ve 5 yaş ve üzerindeki sığırlarda % 9.1 (n=12) oranında seropozitiflik saptanırken; 4-5 yaş aralığındaki sığırlarda ise seropozitiflik saptanmamıştır (Tablo 3). Paratüberküloz seroprevalansının yaş ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (P=0.751).

### Tartışma ve Sonuç

Bu araştırmada Şanlıurfa yöresinde süt sığırlarından alınan serum örneklerinde ELISA ile MAP'a karşı karşı oluşan antikorlar araştırıldı. Paratüberküloz enfeksiyonunun başlaması ile birlikte kandaki antikor seviyesi yükselmektedir. Enfeksiyon kronik seyirli olduğundan 2 yaş altındaki sığırlarda hastalığı görmek mümkün olmadan seroprevalans çalışmalarında, 2 yaş altı hayvanlar tercih edilmemektedir. Yapılan çalışmalarda 2 yaşın altındaki sığırlarda ELISA'nın spesifitesi ve sensitivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir. (Çetinkaya ve ark., 2000; Diequez ve ark., 2009; Nielsen ve Toft, 2009; Öztürk ve ark., 2010).

Paratüberküloz subklinik evrede duyarlı hayvanlara süt ve dışkı ile bulaştığından önemlidir (Moghadam ve ark., 2010). Bulaşma en çok meme başından, süttten ve kolostrumdan olmaktadır (Çetinkaya ve ark., 1997; Çetinkaya ve ark., 2000; Yıldırım ve Civelek, 2013). Bundan dolayı paratüberküloz seroprevalansının subklinik evrede belirlenmesi sürü yönetimi ve sağlığı için önemlidir. (Nielsen ve Troft, 2009; Öztürk ve ark., 2010; Yıldırım ve Civelek, 2013). Orta Anadolu bölgesinde paratüberküloz seroprevalansı mikro ve makro KFT metodlarıyla değerlendirilmesi yapılmış ve sırasıyla %2.3 ve %2.7 oranında seropozitiflik rapor edilmiştir (Vural ve Atala, 1988).

Türkiye genelinde 2 yaş ve üzeri sığırlardan tesadüfi örnekleme ile 8873 kan serumunun ELISA ile incelendiği bir çalışmada 409 (%4.6) örnek pozitif bulunmuş ve Türkiye genelinde gerçek bireysel seroprevalans oranı %3.7 olarak tespit edilmiştir (Atala ve Akçay 2001). Uşak ilinde 3-7 yaşlı 200 Holştayn süt sığırının incelendiği bir çalışmada, dışkı örneklerinin incelenmesiyle, subklinik paratüberküloz seroprevalansı; Ziehl-Neelsen (ZN) boyama ile %17, PCR ile %9.5, Nested PCR ile %20 olarak rapor edilmiştir. Süt örneklerinde ise seroprevalans; ZN boyama ile %15.5, Outer PCR ile %5.5, Nested PCR ile %17.5 olarak tespit edilmiştir (Yıldırım ve Civelek, 2013). Elazığ yöresinde yapılan diğer bir çalışmada süt örneklerinde PCR ile %5 oranında pozitiflik kayda geçilmiştir. Kültür yöntemiyle ise seroprevalansı %3.4 olarak rapor edilmiştir (Çetinkaya ve ark., 2000). Kars ilinde yapılan çalışmada enfeksiyonun seroprevalansı %3.5 olarak tespit edilmiştir (Makav ve Gökçe, 2013). Kırklareli ilinde 23 farklı çiftlikten rastgele olarak seçilen 400 süt sığırlarından alınan serum örnekleri ELISA ile araştırılmış ve incelenen serum örneklerinin %1.5'i seropozitif tespit edilmiştir. ELISA ile paratüberküloz seroprevalansı Burdur yöresinde %6.2 (Öztürk ve ark., 2010), Ardahan yöresinde ise % 4.3 olarak rapor edilmiştir (Karatay ve ark., 2020).

Trakya bölgesinde paratüberküloz seroprevalansının belirlenmesine yönelik iki çalışma yapılmıştır. İki ve ark. (2005) iki yaş üstü sığırlardan rastgele örnekleme yöntemiyle seçilen 96 dışkı numunesini PCR ile araştırmışlar ve pozitiflik saptamamışlardır. Özpınar ve ark. (2015), Edirne, Keşan ilçesi köylerinde bulunan 30 süt çiftliğinden 2 yaş ve üzeri sığırlardan 270 dışkı numunesi ile bu köylerdeki süt tanklarından 45 süt örneğini PCR ile araştırmışlar ve pozitiflik tespit etmediklerini bildirmişlerdir.

Paratüberküloz yönünden farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Doğu Kanada ve Main'de mezbahada kesilen sığırlarında %16.1 (McKenna ve ark., 2004), Hindistan'da %2.71 (Singh ve ark., 2008), İspanya'da %4.03 (Diéguez ve ark., 2007), Kıbrıs'ta %28.6 (Slana ve ark., 2009), Slovenya'da %2.77 (Ocepek ve ark., 2002), Belçika'da %18 (Boelaert ve ark., 2000),

İran'da %3.7 (Yousof ve ark., 2003) ve Amerika Birleşik Devletleri'nde %1.6 - %55 (Fernández-Silva ve ark., 2014) arasında değişen seropozitiflik oranları belirlenmiştir. Pakistan'da sığır ve mandalarda paratüberküloz seroprevalansı sırasıyla %31.8 ve %37.8 (Ahmed ve ark. 2020); Nepal'de ise %4.89 olarak bildirilmiştir (Sharma ve ark., 2019). Araştırmacılar, Paratüberküloz ile yaş, ırk, vücut kondisyon skoru ve lokasyon arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını ancak daha yaşlı ve düşük vücut kondisyon skoru olan sığırlarda daha yüksek prevalans saptamışlardır.

Bu çalışmada incelenen 465 serum örneğinin %4.51'i ELISA ile pozitif saptanmıştır. Bu çalışmada tespit edilen pozitiflik oranı yukarıda bildirilen prevalans oranlarının bazılarında benzerlik gösterirken (Atala ve Akçay, 2001; Çetinkaya ve ark., 2000; Diéguez ve ark., 2007; Makav ve Gökçe, 2013; Sharma ve ark., 2019; Singh et al., 2008; Oceppek ve ark., 2002; Yousof ve ark., 2003); diğer çalışmalarda (Ahmed ve ark., 2020; Boelaert ve ark., 2000; Mc Kenna ve ark., 2004; Slana ve ark., 2009) elde edilen sonuçlardan farklı bulunmuştur. Paratüberküloz seroprevalansındaki farklılıkların, iklim, beslenme, barınma koşulları, çiftliklerin konumu, numune alma prosedürleri gibi faktörlerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. (Çetinkaya ve ark., 1997; Mc Kenna ve ark., 2004).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda çiftlik prevalansının belirlenmesine yeteri kadar önem verilmediği dikkati çekmektedir. Bir işletmede tek bir hayvanda bile etkenin tespit edilmiş olması hastalığın bulaş riski açısından oldukça önemlidir. Öztürk ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada Burdur yöresinde hastalığın sürü prevalansını %58, Makav ve Gökçe (2013) Kars yöresinde %41.6 olarak bildirmişlerdir. Ozsvari ve ark. (2020) Macaristan'da yaptıkları çalışmada enfeksiyonun çiftlik prevalansını %89 olarak bildirmişlerdir. Farklı Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalarda çiftlik prevalansı İrlanda'da %23–34 (Mc Aloon ve ark., 2016), İtalya'da %70 (Pozzato ve ark., 2011) ve Danimarka'da %75–92 (Verdugo ve ark., 2015) olarak rapor edilmiştir. Vilar ve ark. (2015) ise Kuzeydoğu Brezilya'da yaptığı çalışmada %6.7- %100 arasında değişen sürü prevalansı saptamışlar. Bu çalışmada örnekler 25 farklı işletmeden toplanmış ve sürü prevalansı %16 olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda paratüberküloz seroprevalansının yüksek olmasının çiftlikteki hayvan sayısı ile doğru orantılı olduğu bildirilmiştir (Nielsen, 2008; Öztürk ve ark., 2010; Pozzato ve ark., 2011). Bu çalışmadaki çiftlik prevalansı Vilar ve ark. (2015)'nin bildirdiği orana benzerlik gösterirken diğer araştırmacıların çalışmalarında bildirilen oranlardan düşük bulunmuştur. Çalışmamızda sürü prevalans oranının

düşük olması örneklenen işletmelerin küçük olması ile açıklanabilir

Çalışmamızda paratüberküloz belirlenen 12 pozitif ve 4 şüpheli vakanın 5 yaşından büyük olduğu belirlenmekle birlikte paratüberküloz seroprevalansının yaş ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (P=0.751). Bizim çalışmamıza benzer olarak yapılan çalışmalarda; (Nielsen ve ark., 2013; Sharma ve ark., 2019; Stabel, 2006) paratüberküloz açısından farklı yaş gruplarında anlamlı bir fark kaydedilmediği bildirilmiştir.

Bu çalışmada paratüberküloz seroprevalansı ile ırk arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (P=0.267). Kars yöresinde yapılan bir çalışmada, paratüberküloz seroprevalans oranı Simental veya melezlerinde %3.20 (5/156), Montafon veya melezlerinde %3.68 (7/190), Yerli ırk veya melezlerinde %3.70 (2/54) olarak bildirilmiştir (Makav ve ark., 2013). Çetinkaya ve ark. (1997), Jersey ve Guernsey ırklarında paratüberküloz hastalığının Friesian veya diğer ırklara göre daha yaygın olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda ırklar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen diğer çalışmalarda görülen farkın ırklara göre sonuçların değişkenlik göstermesi ırk'a özgü duyarlılık ve kros reaksiyonla ilişkilendirilmekle birlikte nedeni tam olarak bilinmediği bildirilmiştir (Osterstock ve ark., 2010; Roussel ve ark., 2005).

Bu çalışmada Haliliye ilçesinde 1 (%0.48) Eyyübiye ilçesinde 20 (%12.65) pozitiflik saptanırken Karaköprü ilçesinde pozitiflik saptanamamıştır. Paratüberküloz seroprevalansı ile yerleşim yeri arasındaki ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,000). Çalışmamızda ilçeler arasındaki farkın nedeninin ilçeler içinde pozitif hayvanların serbest hareketi ve hijyen eksikliklerinden dolayı bulaşma olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Mısır'da Selim ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada bölgeler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bulmuşlardır. Bölgesel farklılığın paratüberküloz hastalığının aralıklı saçılımı, sağlıklı ve hasta hayvanların aynı bölgede serbest hareketinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışma ile Şanlıurfa ilinde sığırlarda paratüberküloz seroprevalansı araştırılmıştır. Sonuç olarak Şanlıurfa yöresinde paratüberküloz enfeksiyonunun seroprevalansı %4.5, sürü prevalansı ise %16 olarak belirlenmiştir. Hastalık ile mücadelede gerek bölgesel gerekse de ulusal düzeyde daha kapsamlı çalışmalar gerçekleştirilerek enfeksiyonun gerçek boyutlarının belirlenmesi ve buna göre mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

### Çıkar çatışması

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

### Etik izin

Bu çalışma için 09/10/2019-E.43310 numara ile izin alınmıştır. Ayrıca yazarlar Araştırma ve Yayın Etiğine uyulduğunu beyan etmişlerdir.

### Finansal destek

Bu çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19315 proje numarası ile desteklenmiştir.

### Benzerlik Oranı

Makalenin benzerlik oranının sisteme yüklenen raporda belirtildiği gibi %14 olduğunu beyan ederiz.

### Teşekkür

Bu çalışmada desteklerini veren Arş. Gör. Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE'ye teşekkürlerimizi sunarız.

### Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: OYT, AÇ  
Tasarım: OYT  
Denetleme/Danışmanlık: OYT  
Veri Toplama ve/veya İşleme: OYT, AÇ  
Analiz ve/veya Yorum: OYT, AÇ  
Kaynak Taraması: AÇ  
Makalenin Yazımı: OYT, AÇ  
Eleştirel İnceleme: OYT

### Kaynaklar

Ahmed R, Mansoor MK, Hussain I, Saqib M, Hussain MH, Aqib AI, Sadia H, Muhammad J, Irshad A, Prince K, Saleem MZ. 2020: Abattoir based Sero-Survey of *Mycobacterium avium Subspecies Paratuberculosis* in Bovines in District Faisalabad-Pakistan. *Pak J Zool*, 52 (1),115-9.  
Alaçam E, Şahal M, Görgül S, İmren H. Y, Tuncer Ş. D, 1997: Sığır Hastalıkları. 66-68.  
Atala N, Akçay E, 2001: Türkiye genelinde sığır paratüberkülozu prevalansının ELISA ile araştırılması. *Etlik Vet Mik Derg*, 12, 39-48.  
Ayele WY, Machackova M, Pavlik I, 2001: The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet Med-Czech*, 46, 205-224.  
Boelaert F, Walravens K, Biront P, Vermeersch JP, Berkvens D, Godfroid J, 2000: Prevalence of paratuberculosis

(Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet Microbiol*, 77, 269-281.  
Coelho AC, Pinto ML, Silva S, Coelho AM, Rodrigues J, Juste RA, 2007: Seroprevalence of ovine paratuberculosis infection in the Northeast of Portugal. *Small Rum Res*, 71, 298-303.  
Çetinkaya B, Erdoğan HM, Morgan KL, 1997: Risk factors for Bovine Paratuberculosis. II. The multiple analysis of risk ractors for Bovine Paratuberculosis. *Türk J Vet Anim Sci*, 21, 303-306.  
Çetinkaya B, Muz A, Ertaş B, Öngör H, Sezen Y, Gülcü B, 2000: Süt ineklerinde paratüberküloz prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması. *Türk J Vet Anim Sci*, 24, 371-379.  
Diéguez FJ, Arnaiz I, Sanjuan MJ, Vilar MJ, Lopez M, Yus E, 2007: Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* in cattle in Galicia (North WestSpain). *Prev Vet Med*, 82, 321-326.  
Diéguez FJ, Gonzales AM, Menendez S, Vilar MJ, Sanjuan ML, Yus E, Arnaiz I, 2009: Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in dairy cows. *Vet J*, 180, 231-235.  
Fernández-Silva JA, Correa-Valencia NM and Ramírez NF, 2014: Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean,trop. *Anim Hlth Prod*, 46, 1321-1340.  
Gillardoni LR, Paolicchi FA, Mundo SL, 2012: Bovine paratuberculosis: a review of the advantage sanddis advantages of different diagnostic tests. *Rev Argent Microbiol*, 44, 201-215.  
Güner A, 2004: Crohn hastalığının etiolojisinde *Mycobacterium paratuberculosis (Mycobacterium avium sbsp. paratuberculosis)*'in rolü ve besinlerle bulaşma riski. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(1), 48-54.  
Harris NB, Barletta RG, 2001: *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clinic Microbiol Rev*, 14(3), 489-512.  
Ireng LM, Walravens K, Govaerts M, Godfroid J, Rosseels V, Huygen K, Gala JL, 2009: Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium subsp. paratuberculosis* in faecal samples. *Vet Microbiol*, 136, 166-172.  
İkiz S, Bağcigil AF, Ak S, Özgür NY, Loaz A, 2005: Paratuberculosis in cattle in Turkey detected by PCR. *Medycyna Wet*, 61, 881-883.  
Karataş, M. Akyüz, E. & Gökçe, G, 2020: Ardahan Yöresindeki Sığırlarda Paratüberküloz'un Seroprevalansı. *Kocatepe Veterinary Journal*, 13(4), 327-331.  
Makav M, Gökçe E, 2013: Kars yöresi sığırlarında subklinik paratüberkülozun seroprevalansı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19, 913-916.  
McAloon CG, Doherty M L, Whyte P, O'Grady L, More SJ, Messam LLM, ... & Green MJ, 2016: Bayesian estimation of prevalence of paratuberculosis in dairy herds enrolled in a voluntary Johne's Disease Control Programme in Ireland. *Prev Vet. Med*, 128, 95-100.

- Mc Kenna SLB, Keefe GP, Barkema HW, Mc Clure J, Van Leeuwen JA, Hanna P, Sockett DC, 2004: Cow-level prevalence of paratuberculosis in culled dairy cows in Atlantic Canada and Maine. *J Dairy Sci*, 87, 3770-3777.
- Moghadam MT, Sarv S, Moosakhani F, Badiie A, 2010: Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Milk and faecal Samples in Dairy Cattle by PCR and Nested-PCR. *Journal of Animal Veterinary Avances*, 9(24), 3055-3061.
- Moravkova M, Hlozek P, Beran V, Pavlik I, Preziuso S, Cuteri V, 2008: Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues. *Res Vet Sci*, 85, 257-264.
- Nielsen SS, 2008: Transtions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections in cattle. *Vet Microbiol*, 132, 274-282.
- Nielsen SS, Toft N. A, 2009: Review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med*, 88, 1-14.
- Nielsen SS, Toft N, Okura H 2013: Dynamics of Specific Anti-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Antibody Response through Age. *PLoS ONE*, 8(4), 1-6.
- Ocepek, M. Krt, B. Pate, M. And Pogacnik, M, 2002: Seroprevalence of paratuberculosis in Slovenia between 1999 and 2001. *Slovenia Vet Res*, 39, 179-185.
- OIE. 2013: Paratuberculosis (Johne's Disease) Chapter 2.1.11. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 276-291.
- Osterstock JB, Sinha S, Seabury CM, Cohen ND, 2010: Effect of classifying disease states in genetic association studies for paratuberculosis. *Prev Vet Med*, 95, 41-49.
- Ozsvari, L. Lang, Z. Monostori, A. Kostoulas, P. &Fodor, I, 2020: Bayesianestimation of the true prevalence of paratuberculosis in Hungari and airy cattleherds. *Prev Vet Med*, 183, 105-124.
- Özpinar H, Tekiner GH, Karaman O, Kurt Y, 2015: Investigation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in fecal and bulk milk samples from dairy farms in Trace Region of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21, 247-252.
- Özturk D, Pehlivanoglu F, Tok AA, Gunlu S, Guldali Y, Turutoglu H, 2010: Sero prevalence of paratuberculosis in the Burdur province (Turkey), in dairy cattle using the enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA). *Israel J Vet Med*, 65, 53-57.
- Pozzato N, Capello K, Comin A, Toft N, Nielsen S.S, Vicenzoni G, Arrigoni, N, 2011: Prevalence of paratuberculosis infection in dairy cattle in Northern Italy. *Prev Vet Med*, 102, 83-86.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC, 2005: Veterinary Microbiology and Microbial Disease, Black well Publishing, Oxford, UK. 97-105.
- Roussel AJ, Libal MC, Whitlock RL, Hairgrove TB, Barling KS, Thompson JA, 2005: Prevalence of and risk factors for paratuberculosis in purebred beef cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 226, 773-778.
- Selim A. Ali, A. F. &Ramadan, E, 2019: Prevalence and molecular epidemiology of Johne's disease in Egyptian cattle. *Acta tropica*, 195, 1-5.
- Sharma, M. L. Prajapati, M. &Panth, Y, 2019: Demonstration of Circulating Antibodies of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Cattle of Rupandehi District, Nepal. *Nepalese Veterinary Journal*, 36, 23-29.
- Singh, S. Singh, A. Singh, R. Sharma, S. Shukla, N. Misra, S. Singh, P. Sohal, J. Kumar, H. And Patil, P, 2008: Seroprevalence of bovine Johne's disease in buffalo esandcattle population of North Indiausing indigenous ELISA kit based on native *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* 'Bisontype' genotype of goatorigin. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 31, 419-433.
- Slana I, Liapi M, Moravkova M, Kralova A, And Pavlik I, 2009: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cowbulk tank milk in Cyprus detected by cultur and quantitative IS900 andF57 real-time PCR. *Prev Vet Med*, 89, 223-226.
- Stabel J, 2006: Host responsesto *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a complex arsenal. *Anim Hlth Res Rev*, 7, 61-70.
- Verdugo C, Toft N, Nielsen SS, 2015: Within- and between-herd prevalence variation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection among control programme herds in denmark. *Prev Vet Med*, 121, 282-287.
- Vilar AL, Santos CS, Pimenta CL, Freitas TD, Brasil AW, Clementino IJ & Azevedo S S, 2015: Herd-level prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in the State of Paraíba, North eastern Brazil. *Prev Vet Med*, 121(1-2), 49-55.
- Vural B, Atala N, 1988: İç Anadolu bölgesinde sığırlardaki paratüberkülozisin mikro-komplement fizyasyon ve tüp komplement fizyasyon testi ile serolojik olarak tetkiki. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 6, 87-97.
- Yıldırım D, Civelek T, 2013: Prevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Uşak Region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 19(1), 121-126.
- Yousof BG, Farajivand A and Ramin A, 2003: Study on the prevalence of subclinica cattle Johne's Disease in the Urmiabattoir. *Iran J Vet Res*, 7, 123-131.

\*Yazışma Adresi: Osman Yaşar TEL

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

e-mail: oycasar@gmail.com



## Morphological Characteristics of Şanlıurfa Yapışan (Tumbler) Pigeons (*Columba livia domestica*)

Romedi ÇELİK<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Husbandry, 63200, Şanlıurfa, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-6517-3688

Geliş Tarihi: 30.03.2022

Kabul Tarihi: 09.06.2022

**Abstract:** Şanlıurfa is referred to as one of the pigeon domestication centers. It is also believed that most of the pigeon breeds in Turkey originated from Şanlıurfa pigeons. This study was carried out to determine the morphological characteristics of the Şanlıurfa Yapışan (Tumbler) pigeon native to Şanlıurfa in Turkey. The animal material of the study, according to their age, was 06-12 months (Group 1, n=43), 13-24 months (Group 2, n=49), and > 24 months (Group 3, n=36), as well as male (n=65) and female (n=63) 128 heads of Yapışan pigeons. Chosen for their ability to somersault or roll backwards during flight, Tumbler pigeons are one of the domesticated pigeons descended from the Rock pigeon. All the Yapışan pigeons have trotters. The trotter feathers are soft, curved to the side, overlapping, and give the foot a thick appearance. The leg pads above the elbow are curved in and out, giving the feeling of covering between the legs, and the pads do not go beyond the toes. The difference between the sex groups was statistically significant in terms of all the other features except tail length in the morphological features examined. The effect of age on wingspan (P<0.001), wing length (P<0.05) and, tail length (P<0.001) was determined to be significant. The findings of this study verified the view that Yapışan pigeons are a breed. Supporting this result with future genetic characterization and similar studies will be meaningful.

**Keywords:** Biodiversity, Gene sources, Morphological characteristics, Pigeon, Şanlıurfa.

### Şanlıurfa Yapışan (Tumbler) Güvercinlerin (*Columba livia domestica*) Morfolojik Özellikleri

**Özet:** Şanlıurfa güvercin evcilleştirme merkezlerinden biri olarak anılır. Türkiye'deki güvercin ırklarının çoğunun Şanlıurfa güvercinlerinden geldiğine inanılmaktadır. Şanlıurfa Yapışan (Taclacı) güvercinleri, yüzyıllardır Şanlıurfa yetiştiricilerin ilgisini çeken önemli taclacı ıklardan biridir. Bu çalışma Şanlıurfa ve Türkiye'ye özgü Yapışan güvercinlerin morfolojik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Araştırmanın hayvan materyalini, yaşlarına göre 06-12 ay (Grup 1, n=43), 13-24 ay (Grup 2, n=49), ve > 24 ay (Grup 3, n=36) ayrıca farklı cinsiyet gruplarından erkek (n=65) ve dişi (n=63) olmak üzere toplam 128 baş Yapışan güvercini oluşturmuştur. Uçuş sırasında takla atma veya geriye doğru yuvarlanma yetenekleri nedeniyle seçilen Taclacı güvercinleri, Kaya güvercininin soyundan gelen evcil güvercinlerden biridir. Yapışan güvercinlerin hepsinde paça mevcuttur. Ayağa kalın bir görünüm kazandıran paça tüyleri üst üste binik olup yumuşak ve yana kıvrıktır. Dirseğin üstündeki bacak pedleri içe ve dışa doğru kavisli olup bacaklar arasında örtü hissi verir ve pedler ayak parmaklarını geçmez. İncelenen morfolojik özelliklerde, kuyruk uzunluğu dışındaki diğer tüm özellikler açısından cinsiyet grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yaşın kanat açıklığı (P<0.001), kanat uzunluğu (P<0.05) ve kuyruk uzunluğu (P<0.001) üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu çalışmanın bulguları, Yapışan güvercinlerin bir ırk olduğu görüşünü desteklemektedir. Bu sonucun ileride yapılacak genetik karakterizasyon ve benzeri çalışmalarla desteklenmesi anlamlı olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoçeşitlilik, Gen kaynakları, Güvercin, Morfolojik özellikler, Şanlıurfa.

### Introduction

The domestic pigeon seen in our daily lives belongs to the wild pigeon *Columba livia* (Blasco et al., 2014). The feral pigeon was most likely domesticated in the Middle East and Mediterranean region at least 5,000 years ago (Anonymous, 3; Domyan and Shapiro 2017). This situation gave it the title of the oldest domesticated winged bird and, perhaps, made its phenotypic variance the most diverse (Price, 2002). Pigeons have provided some needs of people (food source, communication tool, racing animal) for many years. More importantly, they have satisfied pigeon fanciers with their aesthetic appearance of different

species and symbolize peace today (Atasoy et al., 2013).

They were regarded as sacred religious symbols and war heroes by people who were primarily responsible for their near-world distribution. They are an important model for research in parasitology, behavior, physiology, psychology, neuroscience, microbiology, and other disciplines today (Domyan and Shapiro, 2017).

The monogamy of pigeons provides an advantage for pigeon fanciers in acquiring new breeds and varieties and makes it possible to

develop them by selection (Darwin, 1976). Tumbler pigeons are one of the domesticated pigeons' descendants of the rock pigeon chosen for their ability to somersault or roll backwards during flight. In domestic pigeons, this fascinating feature has been reported for centuries (Anonymous, 1); It is believed to manifest as a reflection of the survival skill that birds of prey develop to escape air attacks. Tumbler pigeons, which are active and playful, are mostly seen in Şanlıurfa, Ankara, Antalya, Diyarbakır, Sivas, Malatya, Çorum and Konya regions in Turkey. Şanlıurfa Yapaşan (tumbler) pigeons, which keep their wings low under their tail, are a breed that has won the attention of breeders from Şanlıurfa. Among the features that distinguish it from other tumblers is that the head structure is slightly angular, and the forehead is full. In addition, the ring around the eyes is less hairy and prominent (Anonymous, 2).

In Şanlıurfa, the number of individual bird keepers referred to as "curious people" is high (Kürkçüoğlu, 2011), and there are many unique places where pigeon shows and trades are held. As such, pigeon breeding stands out not only as a hobby breeding branch, but also as a typical commercial activity. It is believed that most of the pigeon breeds in Turkey came from Şanlıurfa pigeons. Because Mesopotamian figurines, mosaics, coins, and tablets (Biray, 2019) that date pigeons 5000 years ago and depict a place in Mesopotamia point to Şanlıurfa as one of the pigeon' domestication centers.

Although there are studies to determine the characteristics of many different breeds of pigeons, for example, Muradiye Dönek (Özbaşer et al., 2021), Classic Manisa Hünkarisi (Türkeş and Gündüz, 2021), and Alabadem (Erdem et al., 2021), there are no studies describing the characteristics of the Yapaşan (tumbler) pigeon breed in Turkey. Yapaşan pigeon is unique to the Şanlıurfa region, which is one of the domestication centers of pigeons, and pigeon breeding is a tradition in this region. This study was carried out to determine the morphological characteristics of the Yapaşan pigeon native to Şanlıurfa in Turkey, to bring these characteristics to the literature, as well as to make a preliminary study for the registration of the pigeons by determining the breed characteristics.

## Material and Methods

This research was approved by the Harran University Animal Experiments Local Ethics Committee with the decision dated 24.06.2021 and numbered 2021.005.04.

This research was carried out on Yapaşan Pigeons raised by five different local businesses located between 37°09'30"N and 38°47'30"E in Şanlıurfa province. Pigeons were managed and fed

according to the routine schedule of other breeders. The animal material of the study, according to their age, was 06-12 months (Group 1, n=43), 13-24 months (Group 2, n=49), and > 24 months (Group 3, n=36), as well as male (n=65) and female (n=63) 128 heads of Yapaşan pigeons.

Morphological characteristics of pigeons (head type, eye color, beak type, beak tip color, nail color, and body color) were determined with the naked eye and photographic shots (Canon EOS 650D and Canon EF 50 mmF1.8 lens). Special boxes of 60x50 cm and a top light were used for this work. We covered them with a 500x300 cm black cloth to keep them away from external stimuli.

For morphometric measurements; body length, wingspan, wing length, tail length, chest circumference with a tape measure; head length, head width, chest width, shank length, beak length, and depth were measured with a digital caliper (Atasoy et al., 2013; Çelik 2021; Özbaşer et al., 2016).

One-Way ANOVA procedure was used to analyze the difference between groups for the features under consideration; the Independent-Sample T-test analysis method (Özdamar, 2001; Soysal, 2000) was used for the difference between gender groups, and the "Descriptors" method was followed for descriptive statistics, and the factors revealing a significant effect were calculated with the Duncan test (Duncan, 1955).

## Results

In this study, as a result of measurements and observations made from 128 Yapaşan pigeon samples, three different color variations were determined, taking into account the evaluations of the breeders: Gök 71.9% (n=92), Arap 17.2% (n=22), Beyaz 10.9% (n=14) (Figure 1).

The head of the yapaşan pigeon is large with a thick neck. The beak is bluish- grey in the Gök variety and vibrant pink in the Beyaz variety. There were grey spots on the tip of the beak in the Arap variety only (Figure 2).

**Table 1.** Number of wing and tail feathers in Şanlıurfa Yapaşan (tumbler) pigeon.

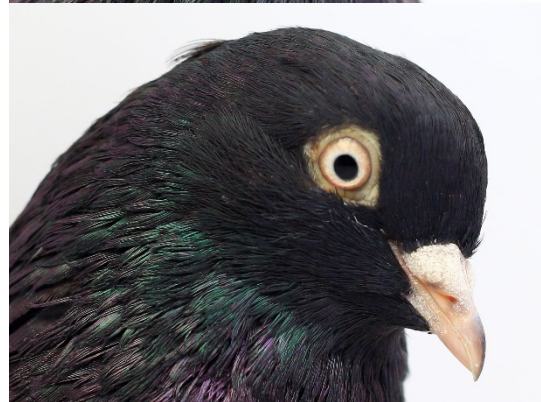
Morphological characteristics	Ratio (%)	(n)
<b>Number of Wing feather</b>		
10-1-10	80.4	103
10-1-11	14.1	18
10-1-9	5.5	7
<b>Number of Tail feather</b>		
12 feathers	82.0	105
13 feathers	14.1	18
14 feathers	3.9	5

The number of wing feathers counted according to the p-a-s method (by following the primary, axial, and secondary feathers, respectively) was also determined as the number of tail feathers were counted (Table 1). In addition, the photographs were taken as visuals to assess the wing (Figure 3) and tail structures (Figure 4) of the Yapişan pigeons.

All Yapişan pigeons have trotters. The leg feathers, which give the foot a thick structure, are soft, slightly curved, and layer by layer. The leg pads above the elbow are curved inwards and outwards, giving the feeling of covering between the legs; these pads do not go past the toes. The trousers below the elbow, which are not very hard and long, are arranged in symmetrical feathers that support each

other. (Figure 5).

In this study, the statistical analysis resulted in significant differences between groups for wing length and beak depth characteristics ( $P<0.05$ ). Also, a considerable difference was head width ( $P<0.01$ ). The mean values for body weight, head length, wingspan, and tail length were statistically significant ( $P<0.001$ ) when measured traits were compared in terms of gender groups, differences for wing length, body length, head width, chest width, and wingspan ( $P<0.001$ ); for body weight, head length, chest circumference and shank length ( $P<0.01$ ); beak depth and beak length ( $P<0.05$ ) were significant (Table 2).



**Figure 1.** Color variants of Yapişan pigeons; Gök, Arap, Beyaz.

**Figure 2.** Head structure, eye colors and beak types of Yapişan pigeons.

## Discussion and Conclusion

Although domestication is more focused on mammals, it covers the importance of other species, such as poultry (Blasco et al., 2014). The domestic

pigeon is derived from the wild rock pigeon and is the oldest domesticated bird species (Cobo-Simón et al., 2020; Price, 2002; Rose et al., 2006). Cuneiform tablets found in Mesopotamia can be accepted as physical evidence since the domestication process of



**Figure 4.** Examples of Wings in Şanlıurfa Yapışan pigeon.

the poultry cannot be proven with bones (Anonymous, 3).

Compared to their wild ancestors, they differ significantly in morphological structure, particularly in the color, length, and distribution of feathers and anatomy of the head, beak, and trotters. These features significantly affect appearance (Özbaşer et al., 2021; Parés-Casanova and Kabir, 2019; Shapiro et al., 2013; Vickrey et al., 2018). As a result of the intense selection and breeding efforts of enthusiasts, many breeds and varieties have emerged around the world (Johnston, 1990; Murton et al., 1972; Price,

2002; Stringham et al., 2012). This is the reason why breeders who purebred breed pays maximum attention to protecting the pedigree of pigeons (Balci et al., 2018; Baptista et al., 2009; Bartels, 2003; Helms and Brugmann, 2007).

The most common area of intense research in pigeons has been the genetic basis of pigmentation for aesthetic or practical reasons. Pigeons display unique color variations. In addition to being a valuable feature that appeals to breeders' visual and aesthetic perceptions, color variations are associated with sexual preference, survival, and





**Figure 5.** Examples of trotters in Şanlıurfa Yapışan pigeons.

**Table 2** The statistical values of the morphometric characteristics detected from Şanlıurfa Yapışan (tumbler) pigeons ( $X \pm Sx$ ).

Yapışan	n	Body weight (g)	Beak length (mm)	Beak depth (mm)	Head length (mm)	Head width (mm)	Shank length (mm)
Group 1	43	290.35±3.58 <sup>a</sup>	16.53±0.61 <sup>a</sup>	7.01±0.82	33.35±1.03 <sup>a</sup>	21.78±1.37 <sup>a</sup>	39.82±3.55
Group 2	49	321.63±2.16 <sup>b</sup>	16.53±0.53 <sup>b</sup>	7.29±1.11	33.99±1.81 <sup>b</sup>	22.20±1.21 <sup>b</sup>	40.43±3.85
Group 3	36	343.89±3.70 <sup>c</sup>	16.58±0.95 <sup>b</sup>	7.35±0.51	34.77±1.24 <sup>c</sup>	22.33±0.57 <sup>b</sup>	40.66±2.95
Total	128	317.38±2.59	16.54±0.39	7.21±0.54	33.99±0.98	22.10±0.70	40.29±2.08
Age		***	-	*	***	**	-
Female	63	309.92±3.83	16.45±0.41	7.10±0.74	33.70±1.13	21.77±1.06	39.60±3.28
Male	65	324.62±3.27	16.63±0.64	7.32±0.77	34.28±1.50	22.41±0.73	40.96±2.31
Sex		**	*	*	**	***	**
Yapışan	n	Wing length (cm)	Wingspan (cm)	Tail length (cm)	Body length (cm)	Chest perimeter (cm)	Chest width (mm)
Group 1	43	28.10±1.94 <sup>a</sup>	65.57±2.65 <sup>a</sup>	13.67±1.64 <sup>a</sup>	33.05±1.52	20.43±1.82	54.31±1.08
Group 2	49	28.42±2.40 <sup>ab</sup>	66.85±2.58 <sup>b</sup>	14.34±1.61 <sup>b</sup>	33.40±1.87	20.86±1.80	54.40±0.83
Group 3	36	28.90±1.96 <sup>b</sup>	67.46±2.15 <sup>b</sup>	14.71±1.67 <sup>b</sup>	33.44±2.32	21.11±2.86	54.66±1.18
Total	128	28.45±1.28	66.59±1.60	14.22±1.01	33.29±1.10	20.79±1.24	54.45±0.59
Age		*	***	***	-	-	-
Female	63	27.98±1.78	65.90±2.13	14.12±1.49	32.82±1.61	20.43±1.74	54.21±0.69
Male	65	28.90±1.66	67.25±2.09	14.32±1.38	33.75±1.26	21.13±1.66	54.67±0.88
Sex		***	***	-	***	**	***

-:  $P > 0.05$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ , a-c means within a column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

predator avoidance requirements for pigeon populations living in nature (Darwin, 1868).

Studies by Si et al. (2021) have observed that the domestic pigeon exhibits three primary iris colors, including yellow to orange "pebble," white "pearl," and black "bull's eye". Pebble and pearl irises

in pigeons are described as luminescent pigment cells with birefringent crystals in the anterior stromal tissue. In some studies, the Bull's-eye feature is associated with white feathers (Bond, 1919; Hollander and Owen, 1939). Our findings on Yapışan pigeons confirm these studies (Figure 2).

Atasoy et al. (2013) reported no age effect regarding body weight, head length and width in their study on tumbler pigeons. However, just like the results obtained in the study on Scandaroon pigeons (Yıldırım et al. 2018), the statistically significant difference between age groups in terms of these characteristics shows that the development of Yapaşan pigeons continues. Moreover, the difference between age groups in terms of wing length, wingspan and, tail length was found to be significant in both studies. The effect of age on wingspan, wing length and tail length ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ) was determined to be significant at the level of significance. The development of this condition with age is essential to remain stable and durable. In the study, body measurements were higher in males in general, except for the tail length. Similar results were found in some tumbler pigeons reared in Ankara.

Mean adult body weight was determined as  $317.38 \pm 2.59$  g in Yapaşan pigeons. This situation is similar to Klasik Manisa Hünkârîsi (Türkeş and Gündüz, 2021) found to be 319.3 g, Tumbler pigeons in province of Ankara as  $321.62 \pm 1.97$  g (Atasoy et al., 2013) and Alabadem pigeons found to be  $321.17 \pm 2.61$  g (Erdem et al., 2021). It is lower than the values obtained for Filo flyer pigeons (Özbaşer et al. 2016) as  $428.85 \pm 5.67$  and for Thrace Roller Breeds (Soysal et al., 2011) as 335.58 g. In this sense, it would not be wrong to define the Şanlıurfa Yapaşan (tumbler) pigeon as a medium-sized breed. This means that instead of selectively improving traits such as body weight, breeders are focusing heavily on the somersault trait of Şanlıurfa Yapaşan pigeons.

Conservation of local gene resources is closely related to the economic, scientific, cultural, and ecological needs of a country. In this sense, animals, a local gene source, and biodiversity elements, are frequently investigated in terms of genetic and various morphological characteristics, not only to shed light on phylogenetic studies but also to develop more efficient production systems and genetic improvement studies (Casanova, 2013). The findings of this study support the view that Şanlıurfa Yapaşan pigeons are a breed. Studies have started to be registering the Şanlıurfa Yapaşan pigeon breed as a local gene source, and it is thought that morphometric characterization studies will significantly contribute to this sense. In addition, it will be meaningful to support the results obtained with future DNA studies.

### Acknowledgements

We would like to thank our valuable pigeon-loving breeders, who provided us with convenience in terms of obtaining the necessary data for the

study in a healthy way and putting their valuable pigeons into the service of the study.

We also thank the Harran University Project Office, which supported this research with project number 21190, for their support.

### Conflict of interest:

The authors declared that there are no actual, potential, or perceived conflicts of interest for this article.

### Ethical Statement

This research was approved by the Harran University Animal Experiments Local Ethics Committee with the decision dated 24.6.2021 and numbered 2021.005.04.

### Financial Support:

This research was supported by Harran University Project Office with project no: 21190.

### Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 9% as stated in the report uploaded to the system.

### Author Contributions:

Idea/Concept: RÇ  
 Design: RÇ  
 Supervision-/Consultancy: RÇ  
 Data Collection and/or Processing: RÇ  
 Analysis and/or Interpretation: RÇ  
 References Scanning: RÇ  
 Writing of the Article: RÇ  
 Critical Review: RÇ

### References

- Anonymous (1) [https://en.wikipedia.org/wiki/Tumbler\\_pigeons](https://en.wikipedia.org/wiki/Tumbler_pigeons), Accessed 10.01.2022.
- Anonymous (2) [https://www.guvercin.info/irklar\\_taklaci\\_guvercin.php](https://www.guvercin.info/irklar_taklaci_guvercin.php), Accessed 10.01.2022.
- Anonymous,(3) [https://en.wikipedia.org/wiki/Domestic\\_pigeon](https://en.wikipedia.org/wiki/Domestic_pigeon), Accessed 07.01.2022.
- Atasoy F, Erdem E, Hacan ÖG, 2013: Determination of morphological characteristics of tumbler pigeons in province of Ankara (Columba livia domestica). Vet J Ankara Univ, 60, 135-143.
- Balçı F, Ardıçlı S, Alpay F, Dinçel D, Soyudal B, Mehlika ER, 2018: The determination of some morphological

- characteristics of Bursa Oynarı pigeon breed. Vet J Ankara Univ, 65 (4), 349-355.
- Baptista L, Martínez Gómez JE, Horblit HM, 2009: Darwin's pigeons and the evolution of the columbiformes: recapitulation of ancient genes. Acta Zool Mex, 25 (3), 719-741.
- Bartels T, 2003: Variations in the morphology, distribution, and arrangement of feathers in domesticated birds. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 298, 91-108.
- Biray B, 2019: Mitochondrial DNA analyses of domestic pigeon breeds (*Columba livia domestica*) in Turkey. Master's thesis, Middle East Technical University.
- Blasco R, Finlayson C, Rosell J, Marco AS, Finlayson S, Finlayson G, Vidal JR, 2014: The earliest pigeon fanciers. Scientific Reports, 4 (1), 1-7.
- Bond CJ, 1919: On certain factors concerned in the production of eye colour in birds. J Genet, 9 (1), 69-81.
- Casanova PMPI, 2013: Morphological similarities between Spanish pigeon breeds. Turk J Vet Anim Sci, 37 (3), 346-351.
- Cobo-Simón I, Márquez-Rodríguez J, Méndez-Cea B, Gallego FJ, Pérez-Fernández M, 2020: Understanding the morphological and genetic distinctiveness of the Spanish pouter pigeons: the Marchenero Pouter as a case study. Ibis, 162 (3), 766-777.
- Çelik R, 2021: Diyarbakır'a özgü güvercin ırkları. Medipres Matbaacılık Ltd. Şti. Malatya.
- Darwin C, 1868: The Variation of Animals and Plants Under Domestication. Asa.GRAY. Newyork.
- Darwin C, 1976: Türlerin Kökeni. İkinci Baskı. Onur Yayınları, Özyurt matbaası. Ankara.
- Domyan ET, Shapiro MD, 2017: Pigeonetics takes flight: evolution, development, and genetics of intraspecific variation. Dev Biol, 427 (2), 241-250.
- Duncan DB, 1955: Multiple range and multiple F tests. Biometrics, 11, 1-42.
- Erdem E, Özbaşer FT, Gürcan EK, Soysal MI, 2021: The morphological and morphometric characteristics of Alabadem pigeons. Turk J Vet Anim Sci, 45 (2), 372-379.
- Helms JA, Brugmann SA, 2007: The Origins of species-specific facial morphology: the proof is in the Pigeon. Integrative and Comparative. Biology, 47 (3), 338-342.
- Hollander WF, Owen RD, 1939: Iris pigmentation in domestic pigeons. Genetica, 21 (5-6), 408-419.
- Johnston RF, 1990: Variation in size and shape in pigeons, *Columba livia*. Wilson Bull, 102, 213-225.
- Kürkçüoğlu SS, 2011: Şanlıurfa Geleneksel Mimarisinde Kuş Takaları (Kuş Evleri). Şanlıurfa Kültür Sanat Tarih ve Turizm Dergisi, 11, 41-43.
- Murton RK, Thearle RJP, Thompson J, 1972: Ecological studies of the Feral pigeon, *Columba livia* var. 1. pulation, breeding biology and methods of control. J Appl Ecol, 9, 835-874.
- Özbaşer FT, Atasoy F, Erdem E, Güngör İ, 2016: Some morphological characteristics of squadron flyer pigeons (*Columba livia domestica*). Vet J Ankara Univ, 63, 171-177.
- Özbaşer FT, Erdem E, Gürcan EK, Soysal Mİ, 2021: The morphological characteristics of the Muradiye Dönek pigeon, a native Turkish genetic resource. Vet J Ankara Univ, 68 (2), 107-112.
- Özdamar K, 2001: SPSS İle Biyoistatistik, Kaan Kitapevi. 4.Baskı. Eskişehir.
- Parés-Casanova PM, Kabir A, 2019: Morphological diversification among pigeon breeds of different aptitudes. WSEAS Trans Biol Biomed, 16, 1-9.
- Price TD, 2002. Domesticated birds as a model for the genetics of speciation by sexual selection. Genetics of Mate Choice: From Sexual Selection to Sexual Isolation. Genetica, 116 (2-3), 311-27.
- Rose E, Nagel P, Haag-Wackernagel D, 2006: Spatio-temporal use of the urban habitat by feral pigeons (*Columba livia*). Behav Ecol Sociobiol, 60 (2), 242-254.
- Shapiro MD, Kronenberg Z, Li C, Domyan ET, Pan H, Campbell M, Wang J, 2013: Genomic diversity and evolution of the head crest in the rock pigeon. Science, 339 (6123), 1063-1067
- Si S, Xu X, Zhuang Y, Gao X, Zhang H, Zou Z, Luo SJ, 2021: The genetics and evolution of eye color in domestic pigeons (*Columba livia*). PLoS genetics, 17 (8), e1009770.
- Soysal Mİ, 2000: Biyometrinin Prensipleri (İstatistik I ve II ders notları), Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi, Tekirdağ.
- Soysal MI, Gürcan EK, Akar T, Alter K, Genç S, 2011: The determination of several morphological features of Thrace roller breeds in raised Thrace region. Journal of Tekirdag Agricultural Faculty, 8 (3), 61-68.
- Stringham SA, Mulroy EE, Xing J, Record D, Guernsey MW, Aldenhoven J T, Shapiro MD, 2012: Divergence, convergence, and the ancestry of feral populations in the domestic rock pigeon. Current Biology, 22 (4), 302-308.
- Türkeş M, Gündüz S, 2021: Klasik Manisa Hünkârîsi Güvercinleri: Tarihçe ve Sınıflandırması. Kebikec: İnsan Bilimleri İçin Kaynak Araştırmaları Dergisi, (51):
- Vickrey AI, Bruders R, Kronenberg Z, Mackey E, Bohlender RJ, Maclary ET, Shapiro MD, 2018: Introgression of regulatory alleles and a missense coding mutation drive plumage pattern diversity in the rock pigeon. Elife, 7, e34803.
- Yıldırım H, Doğan U, Cimrin T, 2018: Determination of the morphological characteristics of Scandaroon pigeon grown in the central of Hatay province (*Columba livia domestica*). The Eurasia Proceedings of Science, Technology, Engineering & Mathematics, 2, 368-375.

\*Correspondence: Romedi ÇELİK

Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Husbandry, 63200, Şanlıurfa, Turkey.

e-mail: romedi@harran.edu.tr

## Investigation of the Efficacy and Antifungal Drug Resistance of Non-Albicans *Candida* Species in Mycotic Mastitis

Hafize Tuğba YÜKSEL DOLGUN<sup>1,a,\*</sup>, Şükrü KIRKAN<sup>1,b</sup>, Volkan ÖZAVCI<sup>2,c</sup>

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Aydın, Turkey.

<sup>2</sup>Dokuz Eylül University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, İzmir, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-1125-5792; <sup>b</sup>ORCID: 0000-0001-5111-8656; <sup>c</sup>ORCID: 0000-0003-3511-3008

Geliş Tarihi: 17.05.2022

Kabul Tarihi: 09.06.2022

**Abstract:** This research aimed to use a conventional and molecular approach to determine *Candida* species isolated from cattle clinical mastitis and examine their antifungal susceptibility. In this research, 100 milk samples with mastitis were collected from dairy farms in five different İzmir districts. On chromogenic agar, 23 *Candida* isolates were isolated from milk samples with mastitis, and 20 (87.0%) isolates were identified as *C. krusei*, two (8.6%) isolates as *C. albicans*, and one (4.3%) isolate as *C. tropicalis*. PCR analysis verified that all *Candida* isolates were *C. krusei*, *C. albicans*, and *C. tropicalis*. According to sequence analysis, it was determined that 11 of the *C. krusei* isolates had >97% similarity to “*Pichia kudriavzeii* ZK1117 5.8S ribosomal gene”; six of the *C. krusei* isolates to “*Pichia kudriavzeii* isolate L-012 small subunit ribosomal RNA gene”; two *C. krusei* isolates to “*Pichia kudriavzeii* isolate 3 internal transcribed spacer 1”; and one *C. krusei* isolates to “*Pichia kudriavzeii* LL11\_078 18S ribosomal gene”; two *C. albicans* isolates to “*Candida albicans* isolate B02 5.8S ribosomal gene”; one *C. tropicalis* isolate to “*Candida tropicalis* isolate CTR1201 18S ribosomal gene”. In the antifungal susceptibility test results, all *Candida* isolates (%100) were resistant to metronidazole and flucytosine. Consequently, it was determined that identifying *Candida* agents and determining antifungal susceptibility in farms with mycotic mastitis will ensure the application of correct treatment protocols and reduce economic losses due to fungal mastitis.

**Keywords:** Antifungal drug resistance, *Candida*, Cattle, DNA sequence, Mastitis.

### Mikotik Mastitislerde Non-Albicans *Candida* Türlerinin Etkinliğinin ve Antifungal İlaç Dirençlerinin Araştırılması

**Özet:** Bu çalışmanın amacı, sığır klinik mastitislerinden izole edilen *Candida* türlerinin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle tanımlanması ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesidir. Bu çalışmada İzmir'in beş farklı ilçesindeki sığır çiftliklerinden 100 mastitisli süt örneği alınmıştır. Mastitisli süt örneklerinden 23 *Candida* izolatu izole edildi ve kromojenik agar ile 20 (%87.0) izolat *C. krusei*, iki (%8.6) izolat *C. albicans* ve bir (%4.3) izolat *C. tropicalis* olarak tanımlandı. Tüm *Candida* izolatları PCR analizi ile *C. krusei*, *C. albicans* ve *C. tropicalis* olarak doğrulandı. Sekans analizine göre *C. krusei* izolatlarından 11 tanesinin “*Pichia kudriavzeii* ZK1117 5.8S ribosomal gene” ile; altı tanesinin “*Pichia kudriavzeii* isolate L-012 small subunit ribosomal RNA gene” ile; iki tanesinin “*Pichia kudriavzeii* isolate 3 internal transcribed spacer 1”, bir tanesinin “*Pichia kudriavzeii* LL11\_078 18S ribosomal gene” ile; 2 *C. albicans* izolatının “*Candida albicans* isolate B02 5.8S ribosomal gene” ile; bir *C. tropicalis* izolatının “*Candida tropicalis* isolate CTR1201 18S ribosomal gene” ile >%97 benzerlik gösterdiği belirlendi. Tüm *Candida* izolatlarının antifungal duyarlılık testi sonuçlarında metronidazol ve flusitozine karşı %100 dirençli olduğu saptandı. Sonuç olarak, mikotik mastitisli çiftliklerde *Candida* etkenlerinin identifikasyonu ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesinin doğru tedavi protokollerinin uygulanmasını sağlayacağı ve mikotik mastitise bağlı ekonomik kayıpları önleyeceği kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Antifungal ilaç direnci, *Candida*, DNA sekansı, İnek, Mastitis.

### Introduction

Mastitis is an infection caused by various microorganisms and reduces milk yield and increases antibiotic treatment and farm costs. It also has a worldwide economic impact since it costs the global dairy industry 35 billion dollars (Du et al., 2018; Khalaf et al., 2021). In mastitis, an immunological response occurs in the mammary gland, which causes a physical change in milk due to the deterioration of the permeability of the milk-blood barrier (Khalaf et al., 2021). Fleischer first described mycotic mastitis caused by *Candida* species in 1930.

Antibacterial misuse, treatment with contaminated antibiotic solutions, and contaminated objects that contact the mammary canal help yeast colonize the gland. *Candida*-induced udder infections account for around 10% of all mastitis cases in cattle (Du et al., 2018). *Candida glabrata* and *Candida krusei* are the most common *Candida* species in mycotic cattle mastitis. In cases of subclinical mastitis, *Candida tropicalis*, *Candida viswanathii*, *Candida guilliermondii*, *Candida norvegica*, and *Candida zeylanoides* are also identified (Bakr et al., 2015).



*Candida* species are identified using bacterioscopy, morphological diagnosis, and biochemical testing, often taking more than three days to complete. Chromogenic-based and standard media such as SDA have been used to diagnose *Candida* species. Diagnostic methods such as API 20C AUX and MALDI TOF are also used. However, in the differential diagnosis and typing of *Candida* species, molecular diagnostic techniques (PCR) and sequencing approaches have begun to assume a prominent role (Bakr et al., 2015).

It has been stated that most antimycotic drugs are not effective in treating *Candida* infections. Antifungal treatments have been developed due to the rise in mycotic infections in recent years. However, it has been noted that the increased usage of antifungal drugs reduces the endogenous fungal flora, resulting in the emergence of more resistant strains while susceptible strains are suppressed (Erbaş et al., 2017). Antifungal-resistant *Candida* species must be identified fast and precisely, and antifungal susceptibility tests must be used to guide therapy (Hizlisoy et al., 2019).

This research aims to isolate *Candida* species that cause fungal mastitis in cattle and to investigate their susceptibility to antifungals.

## Materials and Methods

**Sampling:** In this research, 100 milk samples with clinical mastitis were collected from dairy farms of 50 or more heads in five different districts in the province of Izmir (Beydag, Bayındır, Odemis, Kiraz, Tire). Twenty milk samples with clinical mastitis were collected from each district. All milk samples were taken from the mammary lobe with clinical mastitis of the cattle on these farms. Clinical mastitis was diagnosed by the presence of discomfort, swelling, warmth, and an abnormal look in the milk (bloody milk, watery discharges, clots, pus). Ten ml milk samples were collected from cattle with the above clinical findings and transported to the lab in a cold chain. No ethical permission is required for this study.

**Phenotypic Isolation:** Milk samples (100 µl) were pre-enriched by inoculating them with Sabouraud dextrose broth (HiMedia Lab., India) and incubated at 37°C for 72 hours. Fifty µl of each broth culture were inoculated on SDA (HiMedia Lab., India), chloramphenicol (0,05 mg/ml), and incubated at 37 °C for 48 hours. The isolates were identified according to their macroscopic and microscopic morphologies. *Candida* suspect colonies were passaged onto chromogenic agar (HiCrome™ *Candida* Differential Agar, HiMedia Lab., India) and

incubated for 24 hours at 30 °C. On chromogenic agar, colonies of *C. krusei* are purple, *C. tropicalis* are blue to purple, *C. albicans* are light green, *C. parapsilosis* are white-cream, and *C. glabrata* are cream-white. Identification of *Candida* species was made phenotypically with detection of different color-forming colonies. (Milanov et al., 2014).

**Genotypic Identification:** The isolates for which species identifications were made on chromogenic agar were passaged to SDA, and DNA extractions were performed from the obtained colonies with the DNA extraction kit (UltraClean® Microbial DNA isolation Kit, MoBio Lab., USA). *Candida* DNA samples were kept at -20°C. The genotypic identification of *Candida* isolates was performed utilizing ITS3 (5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3') and ITS4 (5'-CCT CCG CTT ATT GAT ATG C-3') primers (Fujita et al., 2001). PCR reaction was performed in a total volume of 20 µl, including 10 µl of 2x Taq master mix, 0.5 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), and 0.1 µl primers (100 pmol). PCR conditions; a pre-denaturation at 94°C for 4 min, denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec, elongation at 72°C for 1 min for 30 cycles and followed by a final elongation at 72°C for 4 min with using a SimpliAmp thermal cycler (Appliedbiosystems, Massachusetts, USA). PCR amplicons were electrophoresed on 1.5% agarose gel at 80V for 40 minutes. After electrophoresis, agarose gel was visualized on the Vilber Lourmat (Collegien, France) imaging system. Band images were evaluated according to Fujita et al. (2001).

**Sanger Sequencing:** The Sanger sequencing method was used to sequence *Candida* species identified by PCR analysis with ITS3-ITS4 primers (Sanger et al., 1977). Enzymatic purification (ExoSap-IT™, USA) was used to purify PCR amplicons. The purified amplicons were subjected to sequence PCR analysis using the ITS4 primer. After sephadex purification, the amplicons were loaded into the Beckman Coulter CEQ8000 (Fullerton, CA, USA) instrument. The sequences were loaded into a Nucleotide-Blast software, and isolates that showed similarity were classified as *Candida* species.

**Antifungal Susceptibility Test:** The antifungal susceptibility of *Candida* isolates was examined using the disk diffusion method (CLSI, 2018). Colonies were inoculated in brain heart infusion broth and density adjusted to 0.5 MacFarland. Ketoconazole (10 µg), metronidazole (5 µg), nystatin (100 U), flucytosine (1 µg), fluconazole (10 µg) and miconazole (10 µg) were used in this research. Evaluation of zone diameters of antifungals was done according to CLSI M44-A2 standards (CLSI, 2018).

**Results**

**Phenotypic Identification:** In this study, 100 milk samples from the mammary lobe with clinical mastitis of the cattles were inoculated into SDA, and 23 *Candida* suspect colonies were observed in a morphology-based examination for phenotypic isolation. Gram staining was used to investigate microscopic morphologies. All samples (n=23) were Gram-positive coccoid shaped due to Gram staining under the microscope. After microscopic examination, 23 *Candida* suspected isolates were passaged onto chromogenic agar plates. Colored colonies formed duo to passages were evaluated according to the color scale. *Candida krusei* colonies were purple, *C. albicans* colonies were light green, and *C. tropicalis* colonies were blue-purple on chromogenic agar. As a result, 20/23 (87.0%) isolates were identified as *C. krusei*, two (8.6%) isolates as *C. albicans*, and one (4.3%) isolate as *C. tropicalis*. In the Bayindir district, 10 *C. krusei* isolates and one *C. albicans* isolate were isolated from 20 milk samples for the region-based evaluation. In the Kiraz district, 10 *C. krusei* isolates were isolated from 20 milk samples. One *C. tropicalis* isolate was isolated from Beydag, and one *C. albicans* isolate was isolated from Odemis. In the Tire district, no mycotic growth was detected.

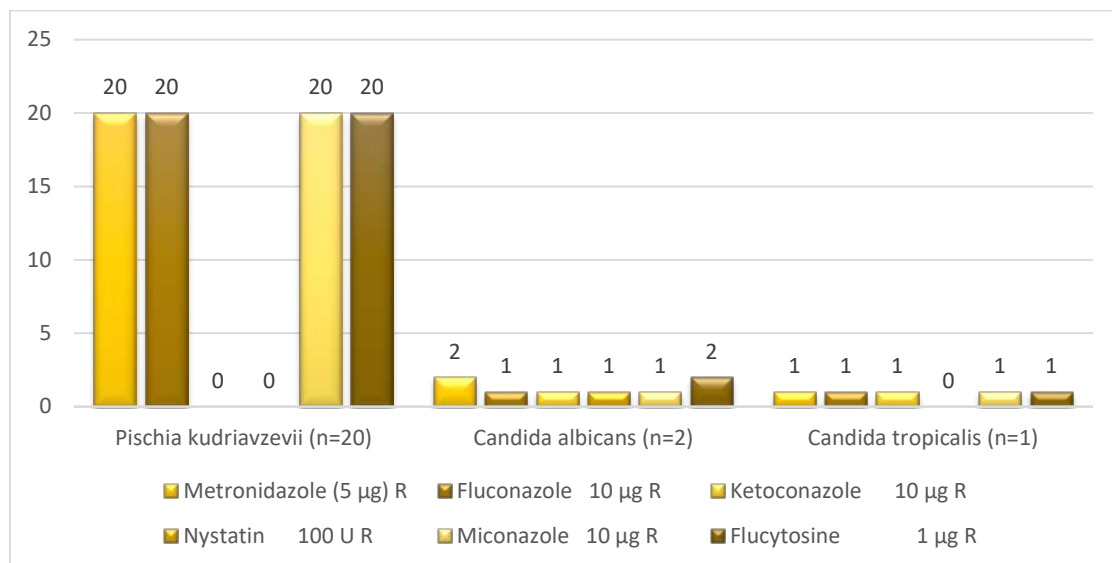
**Genotypic Identification:** A commercial kit was used to extract DNA from 23 *Candida* sp. isolates typed on chromogenic agar, and universal fungal primers (ITS3 and ITS4) were used in PCR reactions. As a result of PCR analysis, it was determined that 20 *C. krusei* isolates were banded at 335 bp, two *C.*

*albicans* isolates at 339 bp, and one *C. tropicalis* isolates at 329 bp in the Vilber Lourmat imaging and analysis system (Fujita et al., 2001). ITS3-ITS4 primers were used to identify genotypically 23 *Candida* sp. isolates obtained by phenotypic methods.

**Sanger Sequencing:** Twenty-three isolates were identified as *C. krusei*, *C. albicans*, and *C. tropicalis*, with sequence analysis of 23 *Candida* isolates described as phenotypic and genotypic. It was determined that 11 of the *C. krusei* isolates showed >97% similarity to the previously described “*Pichia kudriavzevii* ZKI117 5.8S ribosomal gene”, six of the *C. krusei* isolates to “*Pichia kudriavzevii* isolate L-012 small subunit ribosomal RNA gene”, two *C. krusei* isolates to “*Pichia kudriavzevii* isolate 3 internal transcribed spacer 1”, and one *C. krusei* isolates to “*Pichia kudriavzevii* LL11\_078 18S ribosomal gene”. The *C. albicans* strains showed >97% similarity to the “*Candida albicans* isolate B02 5.8S ribosomal gene”. One *C. tropicalis* isolate had >97% homology to “*Candida tropicalis* isolate CTR1201 18S ribosomal gene”.

The phenotypic, genotypic, and sequencing results of *Candida* isolates are shown in Table 1.

**Antifungal Susceptibility Test:** As a result of the antifungal susceptibility tests, all *Candida* isolates (n=23) were resistant to metronidazole, flucytosine 100%, and flucanazole and miconazole 95%. On the other hand, it was determined that all *Candida* isolates (n=23) were sensitive to nystatin and ketoconazole at different percent degrees. The distribution of resistance of *Candida* isolates to antifungal agents is given in Figure 1.



**Figure 1.** Antifungal resistance of *Candida* isolates

**Table 1.** Phenotypic, genotypic and sequencing results of *Candida* isolates

Sample No	Sample Name	Growth on SDA	Growth on Chromogenic Agar	Identification with Chromogenic Agar	ITS3/ ITS4 PCR Results	Sequencing Results
1	BA1	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
2	BA 3A	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
3	BA 6	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
4	BA 8	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
5	BA 9	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
6	BA 10	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
7	BA 11	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
8	BA 13	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
9	BA 14B	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
10	BA 15	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
11	BA 18	Positive	Positive	<i>C. albicans</i>	Positive	<i>Candida albicans</i>
12	BYD 20	Positive	Positive	<i>C. tropicalis</i>	Positive	<i>Candida tropicalis</i>
13	K 2	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
14	K 4	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
15	K 7	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
16	K 8	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
17	K 10	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
18	K 12	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
19	K 13	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
20	K 14	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
21	K 17	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
22	K 20	Positive	Positive	<i>C. krusei</i>	Positive	<i>Pischia kudriavzevii</i>
23	OD 1	Positive	Positive	<i>C. albicans</i>	Positive	<i>Candida albicans</i>

BA: Bayindir; BYD: Beydag; K: Kiraz; OD: Odemis

## Discussion and Conclusion

The yeast has evolved to be a successful commensal in the healthy host. It displays variable characteristics required for survival on mucosal surfaces. The same features become virulence characteristics in abnormal conditions, increasing the yeast's invasive capacities. (Sartori et al., 2014). *Candida krusei* and *Candida kefyr* (non-albicans) are the most isolated species from bovine mastitis. *Candida krusei* has been identified as a cause of bovine mastitis since the 1970s. *Candida krusei* is considered an environmental pathogen, and the occurrence of mastitis is often linked to inadequate hygiene (Dworecka-Kaszak et al., 2012; Turkyilmaz and Kaynarca, 2010; Wawron et al., 2010; Zaragoza et al., 2011).

In research by Seker (2010), 207 (12.7%) *Candida* sp. isolates were found in 1620 subclinical and clinical mastitis milk samples in Turkey (Izmir and Afyon). *Candida* isolates were identified as *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. albicans*, and *C. tropicalis*, respectively (34.8%), (12.6%), (10.1%), (10.1%). Turkyilmaz and Kaynarca (2010) determined that 41 of 339 milk samples with subclinical mastitis in Aydin province in Turkey were positive for yeast, and 34 of the isolates were *Candida* species that were isolated as *C. krusei* (36.6%), *C. kefyr* (29.4%), *C. guilliermondii* (7.3%), *C. famata* (4.9%), *C. rugosa* (2.4%) and *C. utilis* (2.4%). In a study by Zaragoza et al. (2011), they examined 1095 milk samples and isolated yeast in 282 (25.75%) samples. They isolated 23.39% of yeast from healthy cows, 9.92% from cows with subclinical mastitis and 43.27% from cows with clinical mastitis. In the

clinical mastitis group, 40.24% *C. krusei* and 23.17% *C. glabrata* were identified.

Sartori et al. (2014) examined 428 milk samples from cattle with clinical or subclinical mastitis in Brazil and found that 55 (12.8%) samples were *Candida* positive. Du et al. (2018) isolated 256 (51,1%) pathogenic yeast isolates from 482 cattle with clinical mastitis in China. *Candida* sp. was isolated in 60 (23.44%) of the 256 yeast isolates, and *C. krusei* and *C. parapsilosis* were the most common species in clinical mastitis. Sonmez and Erbas (2017) analyzed 100 milk samples with mastitis in Tekirdag, Turkey, and obtained 25 *Candida* isolates. *C. krusei* (32%), *C. albicans* (20%), *C. boidinii* (12%), *C. kefyr* (12%), *C. famata* (12%), *C. spherical* (8%) and, *C. thermophilia* (4%) were identified.

*Candida krusei* prevalence was reported as 11.25% by Zaragoza et al (2011), 34.6% by Sartori et al (2014), and 23% by Du et al (2018). In studies conducted in Turkey, *C. krusei* prevalence was reported as 34.8% by Seker (2010), 36.6% by Turkyilmaz and Kaynarca (2010), and 32% by Sonmez and Erbas. In these studies, *C. krusei* is the most common species.

In this research, *C. krusei* was found in 87% of the 23 *Candida* isolates. This study found that *C. krusei* isolation was higher in the study region than other species, which appears to be consistent with the previous investigations.

In Poland, Dworecka-Kaszak et al. (2010) obtained 55 *Candida* sp. from 66 mastitis milk samples. It was stated that 25 (45%) isolates were *C. parapsilosis*, 15 (27%) were *C. krusei*, 5 (9%) isolates were *C. lusitaniae*, 5 (9%) isolates were *C. famata*, 3 (5%) isolates were *C. guilliermondii*, 1 (2%) isolate was *C. albicans* and 1 (2%) isolate was *C. tropicalis*. Milanov et al. (2014) conducted a study with 332 milk samples with mastitis, and *Candida* sp. were isolated in 20 samples. It was reported that they were identified as 8 (40%) *C. kefyr*, 6 (30%) *C. rugosa*, and 6 (30%) *C. krusei*. Eldesouky et al. (2016) found that the prevalence of *Candida* sp. was 27.3% (n=41) in 150 milk samples with mastitis in Egypt. The prevalence of *C. albicans* (29%), *C. tropicalis* and *C. guilliermondii* (19.5%), *C. glabrata* (14.6%), and *C. krusei* (12.2%), and *C. kefyr* (4.9%) has been found among the identified isolates. Erbas et al. (2017) isolated 17.7% *Candida* sp. from milk samples with mastitis in Aydin, Turkey. It was stated that the isolates were identified as *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. rugose*, *C. glabrata* respectively (26.1%), (21.7%), (17.4%), (17.4%), (13%), (4.4%).

Cilvez and Turkyilmaz (2019) examined 400 milk samples with subclinical mastitis in Denizli, Turkey, and the presence of *Candida* sp. was determined in 96 (24%) samples. According to their sequence

results, they were identified as *C. parapsilosis* (22.9%), *C. krusei* (21.9%), *C. kefyr* (19.8%), *C. albicans* (16.7%), *C. tropicalis* (9.38%), *C. glabrata* (4.2%), *C. guilliermondii* (3.1%), *C. lipolytica* (1.0%), *Trichosporon asahii* (1.0%) with >97% similarity rate at Genbank BLASTN. Onwuhafua et al. (2018) identified 12% yeast isolate in a study of subclinical cattle mastitis in Nigeria. Eleven of these isolates were analysed with DNA sequencing, and 7 of them were identified as *P. kudriavzevii* with a 93%-100% similarity rate at Genbank BLASTN. Hayashi et al. (2012) reported that *Pichia kudriavzevii* is the most common isolated species of cattle mastitis. It was stated that the sequence data they obtained were analyzed with the BLAST system of the National Biotechnology Information Center, and isolates with >99 % similarity were considered conspecific.

In the present research 23 *Candida* isolates were identified as *C. krusei*, *C. albicans*, and *C. tropicalis* with sequence analysis. It was determined that all of the *Candida* isolates showed a >97% similarity rate at Genbank BLASTN. The high similarity rates in this research are thought to be due to regional similarities and differences. When the present study is compared to the previous investigations, it is clear that the isolation rates of *C. krusei* differ and that the dominant *Candida* species vary. Changes in *C. krusei* isolation rates might be related to variances in the farms' sanitary conditions. At the same time, the different rates of isolation of *Candida* species between different geographical regions may result from various factors such as mistaken administration of intramammary antibacterial therapy, yeast-contaminated food or environment, and milking procedures.

Milanov et al. (2014) found that *Candida krusei* isolates were resistant to flucytosine and fluconazole. Du et al. (2018) reported that 14 *Candida krusei* isolates were resistant to fluconazole, ketoconazole, itraconazole and flucytosine. They also stated that 2 *Candida krusei* isolates were resistant to amphotericin and 8 *Candida krusei* isolates were resistant to nystatin. Sonmez and Erbas (2017) found that 25 *Candida* isolates were 100% resistant to amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and miconazole in their study in Turkey. In another study by Erbas et al. (2017), it was reported that *Candida krusei* isolates were 100% resistant to flucytosine and fluconazole and 50% to miconazole. In this research 23 *Candida* isolates were resistant to 100% miconazole and flucytosine. *Candida krusei* (n=20) isolates were resistant to 100% fluconazole and metronidazole, except miconazole and flucytosine, which is critical for research results. Based on these data, *Candida krusei* is naturally resistant to fluconazole (Jamui et al., 2021).

Resistance to other antifungals is considered to emerge due to the antifungals used in the therapy.

Bovine mastitis is one of the infections with the most significant economic impact on farms. In addition to health burden, it also causes irreversible damage to the udder that has lost its health. Studies that previously focused on *C. albicans* are now changing to the point that non-albicans *Candida* species (especially *Candida krusei*) play an essential role in fungal mastitis. This study revealed that *Candida* species from milk with mastitis differ according to regions, and the dominant species is *C. krusei*, both conventionally and molecularly. In antifungal susceptibility tests, it was determined that *Candida* isolates developed resistance to antifungals. Consequently, it was found that in farms with *Candida*-origin mastitis, thorough separation of the causative organisms and continued treatment operations with antifungal medicines indicated by antifungal susceptibility testing of the obtained isolates would be economically beneficial.

### Conflict of Interest

The authors stated that they did not have anyreal, potential or perceived conflict of interest.

### Ethical Approval

This study is not subject to HADYEK permission in accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees".

### Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 12% as stated in the report uploaded to the system.

### Author Contributions

Motivation / Concept: HTYD, SK, VÖ  
 Design: HTYD, SK, VÖ  
 Control/Supervision: HTYD, SK, VÖ  
 Data Collection and/or Processing: HTYD, SK, VÖ  
 Analysis and / or Interpretation: HTYD, SK, VÖ  
 Literature Review: HTYD, SK, VÖ  
 Writing the Article: HTYD, SK, VÖ  
 Critical Review: HTYD, SK, VÖ

### References

Bakr EM, El-Tawab A, Elshemey TM, Abd-Elrhman AH, 2015: Diagnostic and Therapeutic Studies on Mycotic Mastitis in Cattle. *Alex J Vet Sci*, 46 (1), 138-145.

- Cilvez P, Turkyilmaz S, 2019: Molecular Diagnosis of *Candida* Species Isolated from Cases of Subclinical Bovine Mastitis. *Israel J Veterinary Med*, 74 (3), 134-140.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guidelines. Second Edition. CLSI Document M44-A2. Wayne, PA, USA: Clinical Laboratory Standard Institute; 2018.
- Du J, Wang X, Luo H, Wang Y, Liu X, Zhou X, 2018: Epidemiological investigation of non-albicans *Candida* species recovered from mycotic mastitis of cows in Yinchuan, Ningxia of China. *BMC Vet Res*, 14 (251), 1-9.
- Dworecka-Kaszak B, Krutkiewicz A, Szopa D, Kleczkowski M, Biegańska M, 2012: High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *Sci World J*, 2012, 5.
- Eldesouky I, Mohamed N, Khalaf D, Salama A, Elsify A, Ombarak R, El-Ballal S, Effat M, Alshabrawy M, 2016: *Candida* mastitis in dairy cattle with molecular detection of *Candida albicans*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 22 (3), 461-464.
- Erbas G, Parin U, Kirkan S, Savasan S, Ozavci V, Yuksel HT, 2017: Identification of *Candida* strains with nested PCR in bovinemastitis and determination of antifungal susceptibilities. *Turk J Vet Anim Sci*, 41 (6), 757-763.
- Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T, 2001: Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J C Microbiol*, 39 (10), 3617-3622.
- Hayashi T, Sugita T, Hata E, Katsuda K, Zhang E, Kiku Y, Sugawara K, Ozawa T, Matsubara T, Ando T, Obayashi T, Ito T, Yabusaki T, Kudo K, Yamamoto H, Koiwa M, Oshida T, Tagawa Y, Kawai K, 2013: Molecular-based identification of yeasts isolated from bovine clinical mastitis in Japan. *J Vet Med Sci*, 75 (3), 387-390.
- Hizlisoy H, Ertas Onmaz N, Al S, Karadal F, Yildirim Y, Gonulalan Z, Gumussoy KS, Aydemir GD, Tekinsen FK, Dinc G, 2020: Clonal diversity and antifungal susceptibility of *Candida* spp. recovered from cow milk. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 70 (1), 40-49.
- Jamiu AT, Albertyn J, Sebolai OM, Pohl CH, 2021: Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Medical Mycology*, 59 (1), 14-30.
- Khalaf DD, Soliman MMH, Mansour AS, 2021: Conventional and molecular identification of mycotic mastitis caused by *Candida* in farm animals. *Int J Vet Sci*, 10 (1), 64-68.
- Khalaf RA, Fattouh N, Medvecký M, Hrabak J, 2021: Whole genome sequencing of a clinical drug resistant *Candida albicans* isolate reveals known and novel mutations in genes involved in resistance acquisition mechanisms. *J Med Microbiol*, 70 (4), 001351.
- Milanov D, Prunic BO, Velhner MA, Bojkovski J, 2014: Diagnosis of yeast mastitis in dairy cows. *Lucr Stiint Med Vet*, 47 (1), 56-64.
- Onwuhafua EU, Kwaga PJKP, Bale J, 2018: Diversity of yeasts associated with bovine subclinical mastitis in periurban dairy farms in Kaduna metropolis, Kaduna state, Nigeria. *Int J Infect Dis*, 73, 285-285.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson R, 1977: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5463-5467.
- Sartori LCA, Santos RC, Marin JM, 2014: Identification of *Candida* species isolated from cows suffering mastitis in four Brazilian states. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 66 (5), 1615-1617.
- Seker E, 2010: Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in Western Turkey. *Mycopathologia*, 169 (4), 303-308.
- Sonmez M, Erbas G, 2017: Isolation and identification of *Candida* spp. from mastitis cattle milk and determination of antifungal susceptibilities. *Int J Vet Sci*, 6 (2), 104-107.
- Turkyilmaz S and Kaynarca S, 2010: The slime production by Yeast Isolated from Subclinical Mastitic Cows, *Acta Vet Brno*, 79, 581-586.
- Wawron W, Bochniarz M, Piech T, 2010: Yeast mastitis in dairy cows in the middleeastern part of Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 54, 201-204.
- Zaragoza CS, Olivares RA, Watty AE, Moctezuma Ade L, Tanaca LV, 2011: Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Rev Iberoam Micol*, 28(2), 79-82.
- \*Correspondence:** Hafize Tuğba YÜKSEL DOLGUN  
Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Aydın, Turkey  
**e-mail:** tugba.yuksel@adu.edu.tr

## Şanlıurfa İlindeki İshalli Buzağılarda Bovine Coronavirus Varlığının ELISA Yöntemi ile Araştırılması

Ramazan ABİKOĞLU<sup>1,a</sup>, İrfan ÖZGÜNLÜK<sup>2,b,\*</sup>

<sup>1</sup>DOLLVET, Şanlıurfa Organize Sanayi, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-6971-9043, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-6003-8612

Geliş Tarihi: 18.05.2022

Kabul Tarihi: 15.06.2022

**Özet:** Sığır yetiştiriciliğinde önemli sorunlardan biri olan yeni doğan buzağı ishallerinde sığır Coronavirus (BCoV) enfeksiyonları çok sık görülmektedir. Bu çalışmanın amacı Şanlıurfa ilindeki ishallerde BCoV enfeksiyonunun araştırılmasıdır. Bu çalışmada, klinik muayeneyi takiben ishalleri (≤3 ay) 94 buzağı örneklenmiştir. BCoV antijen varlığının tespiti için Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kullanıldı. Toplamda 5 dışkı numunesi BCoV pozitif (%5.32) belirlendi. Elde edilen bu sonuç BCoV Şanlıurfa ilindeki ishallerde düşük oranda olduğunu gösterdi. Bununla beraber enfeksiyonun, sığır popülasyonlarında hızlı bir yayılma eğiliminde olduğu göz önünde bulundurularak tedavi maliyetleri ve buzağı ölümlerinden kaynaklanan büyük ekonomik kayıplara neden olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Buzağı, Coronavirus, ELISA, İshal.

### Investigation of the Presence of Coronavirus by ELISA Method in Diarrheic Calves in Sanliurfa Province

**Abstract:** Bovine coronavirus (BCoV) infections are widespread in newborn calf diarrhea, which is one of the critical problems in cattle breeding. This study aims to investigate BCoV infection in calves with diarrhea in Sanliurfa province. In this study, 94 calves with diarrhea (≤3 months) following clinical examination were sampled. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the presence of BCoV antigen. A total of 5 stool samples were found to be BCoV positive (5.32%). This result showed that BCoV was low in calves with diarrhea in Sanliurfa province. However, considering the rapid spread of the infection in cattle populations, it is thought that it may cause significant economic losses due to treatment costs and calf deaths.

**Keywords:** Calf, Coronavirus, Diarrhea, ELISA.

### Giriş

Coronavirüsler; insanların ve birçok hayvanın (sığır, köpek, kedi, kanatlı, tavşan, sıçan ve domuz) sindirim, solunum, dolaşım gibi sistemlerinde meydana getirdiği zararlar ile tüm vücutta etkisini gösterebilen ve çok geniş bir virüs familyasını temsil eden enfeksiyöz ajanlardan biridir. İlk defa 1968 yılında elektron mikroskopu ile morfolojik olarak tespit edilmişlerdir (Brunauer, 2021; Hodnik ve ark., 2021; Lotfollahzadeh ve ark., 2020; Vlasova ve Saif, 2021).

Bovine Coronavirus (BCoV), aile ismini virionun taç (Latince corona=taç) şeklindeki görünümünden almakta ve Coronavirus virionları pleomorfik yapıda, genelde yuvarlak, yaklaşık 80-220 nm çapında zarflı partiküllerdir ve sarmal, segmentsiz, pozitif polariteli ssRNA genomuna sahiptir (Barker, 2008; Brunauer, 2021; Lai ve ark., 2007; Perlman ve Netland, 2009; Vlasova ve Saif, 2021).

BCoV yenidoğan buzağılarda şiddetli diareye (CD: calf dysentery), yetişkin sığırlarda kış dizanterisi (WD: winter dysentery), buzağı ve besi sığırlarında

ise solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur (Amoroso ve ark., 2020; Brunauer, 2021; Decaro ve ark., 2008; Park ve ark., 2006; Saif, 2010).

Şanlıurfa GAP projesinin tamamlanması ile tarım ve hayvancılık yönünden önemli bir yer edinmiştir. Günümüzde yeni ve daha kapsamlı büyük baş yetiştiriciliği artarken eski işletmelerde kapasitesini ciddi oranda artırdığı gözlemlenmektedir. Yapılan çalışmalar, Buzağı ölümlerinin ABD için %57 (Gomez ve Weese, 2017), Kore için %53,4-68,7 (Chae ve ark., 2021), İran için %58 (Azizzadeh ve ark., 2012) ve Uruguay için %15,2 (Caffarena, 2020)'sinin neonatal buzağı ishalinden kaynaklandığı bildirilmektedir. İshallerde farklı viral enteropatojenlerin varlığının karşılaştırdıkları çalışmada, Gomes ve Weese (2017) coronavirus %3-79 oranı ile rotavirus için bildirdiği orana (rotavirus %7-80) çok yakın bir oranla ikinci sırada yer aldığını belirtmişlerdir.

Bu çalışmanın amacı, yeni doğan buzağılarda ölümlere neden olan ishal etkenlerinden olan

coronavirüslerin Şanlıurfa yöresindeki enterik vakalarındaki prevalansı araştırılması ve bölge hayvancılığına katkı sağlanmasıdır.

## Materyal ve Metot

**Gaita Örneklerinin Toplanması:** Çalışmada kullanılan materyaller Şanlıurfa merkez ve ilçelerinden toplandı. Enterit problemi duyumu alınan küçük aile işletmeleri ve diğer işletmeler ziyaret edildi. Bu çalışma DOLLVET A.Ş. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (DOLLVET-HADYEK) 10.06.2016 tarih ve 2016/21 numaralı etik kurul izni ile yapılmıştır. Gaita örneklerinin toplanma tarihleri ve çiftlik kodlarına göre dağılımı Tablo 1'de gösterildi.

**Tablo 1.** Gaita örneklerinin toplanma tarihleri ve çiftlik kodlarına göre dağılımı.

Çiftlik No	Örnekleme Tarihi	Örnek Sayısı
1	17.02.2015	16
2	09.08.2015	12
3	24.02.2016	24
4	07.03.2016	10
5	06.04.2016	3
6	07.04.2016	15
7	08.02.2018	14
<b>Toplam Örnek Sayısı</b>		<b>94</b>

Muayene edilen ve ishal semptomu gözlemlenen üç aylık ve daha küçük 94 holstein ırkı buzağıdan gaita örneklendi. Örnekleme sırasında buzağılarda cinsiyet ayırımı yapılmazken yaşları not edilip 6 gruba ayrılarak Tablo 2'özetlendi.

**Tablo 2.** Yaş gruplarına göre örnekleme dağılımı.

Yaş (gün)	Örneklenen Gaita sayısı
1-7	5
8-14	2
15-21	13
22-30	57
31-60	15
61-90	2
<b>Toplam</b>	<b>94</b>

Örnekleme direkt steril eldiven yardımı ile anüsten gaita alınarak yapıldı. Ticari steril gaita kaplarına

aktarılan numuneler, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarında -20 °C'de muhafaza edildi.

**Gaita örneklerinde ticari ELISA ile BCoV antijen varlığının araştırılması:** Virolojik teşhis amacıyla ticari ELISA (Bio-X Easy Digest 2 ELSA Kit, kat. No: BIO K 314/1, Belgique) kiti kullanıldı. Tetkikler üretici firma tarafından gönderilen prosedüre uygun şekilde yapıldı. Öncelikle bütün ticari kit içeriği teste başlamadan 1 saat önce oda sıcaklığında (yaklaşık 24 °C) tutuldu. Bu süre sonunda derin dondurucudan alınarak oda ısısına getirilmiş olan gaita örnekleri ependorf tüplerine alınıp eşit hacimde sulandırma solüsyonu ile sulandırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Doğal olarak çökelen gaita santrifüj uygulanmadan üst kısmındaki içerikten, test ticari firmanın belirttiği prosedüre uygun olarak yapılmıştır. ELISA okuyucusu ile 450 nm dalga boyunda elde edilen OD değerleri kit prosedüründe bulunan formüle göre değerlendirilerek sonuçlar yorumlandı.

**İstatistiksel analiz:** BCoV pozitivite ve yaş grupları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için SPSS 23.0 programında chi-square ( $\chi^2$ ) testinden yararlanıldı.

## Bulgular

ELISA ile yapılmış çalışma sonucunda toplam 94 adet ishali buzağının 5 (%5,32) tanesinde BCoV antijeni tespit edilirken kalan 89'unda (%94,68) ise coronavirus antijeni yönünden negatif oldukları tespit edilmiştir. Çiftlik bazında değerlendirildiğinde örnekleme yapılan çiftliklerden 3 (%42) adedinde coronavirus varlığı belirlenmiştir. Çiftlikler değerlendirildiğinde antijen varlığının %0,0 ile %13,33 arasında değişen bir dağılım gösterdiği gözlemlendi. ELISA testi sonucunda elde edilen veriler Tablo 3'de gösterildi.

Yenidoğan diareli buzağuların yaş gruplarına göre coronavirus antijen pozitif dağılımları incelendiğinde (Tablo 4); pozitif olgularının ilk haftada %20 (1/5) ve 4. haftada %7,02 (4/57) olduğu, ikinci ve üçüncü haftalarda ile 31 gün ve daha büyük yaşa sahip buzağılarda ise pozitiflik tespit edilmediği görüldü.

Pozitif buzağuların yaşı göz önünde bulundurulduğunda; bir buzağının iki günlük, bir tanesinin 25 ve üç buzağının bir aylık olduğu gözlemlendi. Pozitif bulunan buzağuların yaşlarının toplamı 117 gün ve 5 buzağıda antijen varlığı ortaya konulduğundan ( $117/5=23.4$ ), bovine coronavirus antijeni yönünden pozitif olan buzağuların yaş ortalaması 23,4 gün olarak saptandı (Tablo 5). Yaş grupları arasında pozitiflik chi-square ( $\chi^2$ ) testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak fark önemsiz olarak ( $P>0.05$ ) tespit edildi.



**Tablo 3.** Çiftliklere göre Bovine Coronavirus (BCoV) ELISA Sonuçları.

Çiftlik No	Örneklenen hayvan sayısı	Coronavirus Ag pozitif buzağılar		Coronavirus Ag negatif buzağılar	
		Adet	%	Adet	%
1	16	1	6,25	15	93,75
2	12	0	0,0	12	100
3	24	2	8,33	22	91,67
4	10	0	0,0	10	100
5	3	0	0,0	3	100
6	15	2	13,33	13	86,67
7	14	0	0,0	14	100
<b>Toplam</b>	<b>94</b>	<b>5</b>	<b>5,32</b>	<b>89</b>	<b>94,68</b>

**Tablo 4.** Yaş gruplarına göre Coronavirus pozitif buzağı sayısı ve dağılımı.

Yaş grubu (gün)	Örneklenen buzağı sayısı	Coronavirus pozitif buzağı	
		+ (adet)	% (oran)
1-7 gün	5	1	20,00
8-14	2	0	0,00
15-21	13	0	0,00
22-30	57	4	7,02
31-60	15	0	0,00
61-90	2	0	0,00
<b>Toplam</b>	<b>94</b>	<b>5</b>	<b>5,32</b>

**Tablo 5.** Pozitif buzağuların yaş ortalaması.

Örnek no:	Gün				
	1	2	3	4	5
<b>Yaş (Gün)</b>	30	25	30	2	30
<b>Pozitif buzağuların toplam yaşı/pozitif buzağı sayısı</b>	117/5				
<b>Pozitif hayvanların yaş ortalaması</b>	23,4				

## Tartışma ve Sonuç

Şanlıurfa yöresinde hayvancılık koyun, keçi ve sığır yetiştiriciliğine dayanmaktadır. Sığır yetiştiriciliği hem sütçü hem de besi yetiştiriciliği şeklinde olup küçük aile işletmeleri ve sayısı az da olsa entansif işletmeler bulunmaktadır. Sığır yetiştiriciliği hangi yönlü olursa olsun çeşitli faktörlerden meydana gelen yavru kayıpları ekonomik olarak önemlidir. Meydana gelen kayıpların önemli bir bölümü ise ilk bir ay içinde meydana gelen ishal nedenli buzağı ölümleri olmakta ve önemine binaen yenidoğanların ishali (neonatal calf diarrhea) olarak

isimlendirilmiştir. Buzağı kayıplarına neden olan neonatal buzağı ishalleri doğumdan sonraki ilk saatlerden başlamak üzere ve yaşamın ilk birkaç ayında etkilidir. Neonatal calf diarrhea etiyolojisinde; *E. coli*, *Cl. perfringens*, *Salmonella spp.*, *Camphylobacter jejuni* ve *Chlamydia spp.* benzeri bakteriyel, rotavirus, coronavirus, parvovirus, adenovirus, astrovirus, calicivirus gibi viral, Coccidia, Giardia, Cryptosporidium gibi paraziter nedenler rol oynamaktadır (Atlı ve ark., 2018; Al ve Balıkcı, 2012; Chae ve ark., 2021; De la Fuente ve ark., 1998; Gulliksen ve ark., 2009).

Yeni doğan buzağuların ishal olgularında coronavirus varlığı dünyanın farklı ülkelerinde

yapılan araştırmalarda %0,91 ile %68,6 değişen oranlarında olduğu bildirilmiştir (Al Mawly, 2015; Athanassios 1994; Bok ve ark., 2015; Brunauer, 2021; Coura ve ark., 2015; Garcia ve ark., 2000; Izzo ve ark. 2011). Yenidoğan buzağuların ishal olgularında coronavirus varlığının ve neden olduğu ekonomik kayıpların önemine dikkat çekilen bu çalışmalarda, Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan ve yedi yıllık bir periyodu kapsayan, 2 kaynağın ele alındığı çalışmada yeni doğan buzağı ishalleri nedeniyle yıllık ortalama buzağı kayıpların %17,5 ve %29,7 oranlarında coronavirus nedenli olduğu, aynı çalışmada ekonomik kaybın mali bilançosu yapılmış ve yeni doğan buzağı ishalleri nedeniyle yıllık ortalama maddi kayıpların 95 milyon dolar olduğu ve bunun 16,7 milyon \$ kadarı coronavirus nedenli diare enfeksiyonları sebebiyle oluştuğu vurgulanmıştır (House 1978). Debelo ve ark. (2021) Etiyopya'da yapılan bir çalışmada ise BCoV pozitifliği %0,91 (1/110) olarak rapor edilmiştir. Etiyopya'da başka bir çalışmada ise 108 ishali buzağıda beş farklı enterik patojenin varlığını araştırmış, bovine coronavirusun %38,9 oranı ile enteropatojen ajanlar arasında ilk iki sırada yer aldığını ifade etmişlerdir (Abraham ve ark., 1992). Coura ve ark. (2015) Brezilya'da yaptıkları çalışmada BCoV prevalansını %68,6 (46/67) olarak tespit etmişlerdir. Athanassios ve ark. (1994) Kanada'nın Quebec bölgesi diareli buzağılardan elde ettikleri toplam 197 dışkı örneğini ELISA ve direkt EM yöntemleri ile inceledikleri çalışmada BCoV antijen varlığını %11,17 (22/197) olarak belirlerken, yenidoğanların ishal olgularında coronavirus oranını %22,68 (22/97) olarak tespit etmiş ve ishal olgularının en önemli patojenleri arasında coronavirusları bildirmişlerdir. İspanya'da ishali buzağılardaki enteropatojenlerin yaygınlığı üzerine yapılan bir çalışmada, PAGE yöntemiyle %7,3 oranında BCoV pozitifliği saptadıklarını bildirmişlerdir (De la Fuente ve ark., 1998). İspanya'da yapılan diğer bir çalışmada ise ishali buzağılardan elde ettikleri dışkıları inceleyen Garcia ve ark. (2000) buzağılarda yakın oranda coronavirus varlığı bildirmişlerdir ve %5,05 (11/218)'lik pozitif tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. Izzo ve ark. (2011) Avustralya'daki ishali buzağılarda enteropatojenik ajanların dağılımı üzerine yaptıkları araştırmalarında %21 oranında BCoV saptamışlardır. Arjantin'de ise, Bok ve ark. (2015) 17 yıllık bir periyotta elde ettikleri 1058 ishali dışkı örneğini RT-PCR ile yaptıkları tetkiklerinde buzağuların 63'ünde BCoV varlığını bildirmişlerdir. Chae ve ark. (2021) Kore'de yaptıkları çalışmalarında coronavirus için pozitifliği %8,5 (46/544) olarak tespit etmişlerdir. Coura ve ark. (2015) Brezilya'da sağlıklı ve ishali sığırların bulunduğu bir süt sığırı işletmesinde enteropatojenik ajanları belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada

%68,6 (46/67) oranında BCoV yönünden pozitiflik bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, Şanlıurfa merkez ve ilçelerden toplanan 94 adet (Tablo 2) ishali buzağı dışkısı ELISA testi ile BCoV varlığı yönünden araştırıldı ve ELISA tekniği ile incelenen 94 adet ishali buzağıya ait gaita örneğinden %5,32'sinde (5/94) coronavirus antijen varlığı belirlendi. Araştırmada belirlenen oranlar daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, Debelo ve ark., (2021)'inin bildirdikleri sonuçtan yüksek iken De La Fuente ve ark. (1998), Garcia ve ark. (2000) ve Chae ve ark. (2021) verilerine oldukça yakın ancak diğer bilim insanlarının verilerinden oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu çalışmada belirlenen oranların düşük olması, diğer araştırmalarda örnekleme yaptıkları çiftliklerin 100 baş ve üzeri kontrollü yetiştiriciliğin yapıldığı sığır çiftliklerinden olmasına bağlanabilir. İshale sebep olan enfeksiyonların buzağular arasındaki yayılımının sürü büyüklüğüyle de bağlantılı olabileceği göz önüne alındığında, toplanan örneklerin bir kısmının halk elindeki küçük tarz bireysel işletmelerden, bir kısmının ise 100 baş ve üzeri büyük tarz çiftliklerden sağlanmış olması dikkate alınmalıdır.

Neonatal buzağuların ishal olgularında coronavirus varlığı Türkiye'de farklı illerde yapılan çalışmalarda %0,54 ile %37,27 değişen oranlarında olduğu bildirilmiştir (Aksoy ve ark., 2021; Yavru ve ark., 2016). Alkan (1998) Türkiye'de ishali buzağı dışkılarında rotavirus ve coronavirus varlığını belirlemek amacıyla yaptığı bir çalışmada, 83 adet ishali buzağıdan elde ettiği dışkı örneklerinde %18 oranında BCoV yönünden pozitiflik tespit ederek, epidemiyolojik açıdan yaptıkları değerlendirmede etkenin ülkemizdeki durumunun yaygın olduğunu bildirmiştir. Takip eden yıllarda da ülkemizdeki enteropatojenik ajanlar çok sayıda araştırmacı tarafından birçok çalışma ile araştırılmış olup farklı sonuçlar elde edilmiştir. Eskiizmirliler ve ark. (2001) Türkiye'nin birçok yerinden yaptığı örneklemede ishali buzağılarda %13'ünde coronavirus etkenini saptamışlardır. Erdoğan ve ark. (2003) ise Kars bölgesinde yenidoğan buzağılardaki BCoV yaygınlığını belirlemek için 104'ü ishali 43'ü normal buzağı dışkısını ELISA ile antijen varlığı yönünden incelemişler ve ishali buzağuların %1'inde BCoV yönünden pozitiflik tespit etmişlerdir. Hasırcıoğlu (2005), Malatya ili, halk elindeki 58 ahırda yer alan, yaşları 3 gün ile 6 ay arasında değişen 63 adet ishali buzağıdan ve bunların annelerinden elde ettiği örnekler ile yaptığı çalışmada, ishal semptomu gösteren 63 adet buzağıya ait dışkı örneklerinden 2 adedinde (%3,18) coronavirus antijen varlığı saptamıştır. Hasöksüz ve ark. (2005) Ege bölgesinden örnekleme yapmış, 1 ile 30 günlük diare semptomu gösteren 35 buzağıdan 13 (%37,1)'ünde coronavirus tespit etmişlerdir. Çabalar ve ark. (2007) Van'da 1 ile

30 günlük ishali 89 buzağıdan alınan dışkı örneklerinin 1'inde (%1,12) coronavirus belirlenmişlerdir. Gumusova ve ark. (2007) ise Türkiye'nin farklı yerlerinden topladıkları 100 adet sağlıklı ve ishali buzağılardaki dışkıları ELISA ile antijen varlığı yönünden inceledikleri bir çalışmada %1 oranında BCoV antijen pozitifliği saptadıklarını bildirmişlerdir. Ok ve ark. (2009) Konya yöresindeki 8 farklı çiftlikten 2-30 günlük olan 82'si ishal ve 18'i normal İsviçre-holstein olan buzağılardan yaptıkları örneklemede yenidoğanların enterik etiyolojisini incelemiş ve ishal semptomlu buzağılarda rotavirus için %28,84 (15/52), coronavirus için %13,41 (11/82), E. Coli için %21,15 (11/52) pozitiflik tespit etmişlerdir. Yavru ve ark. (2016) Burdur yöresinde yerleşik 25 farklı sütçü sığır işletmesinde bulunan 3500 sığır ve yavrusunun klinik muayenesi neticesinde ishal bulgusu tespit ettikleri 184 buzağıya ait gaita örnekledikleri çalışmada, aynı zamanda bu yavrular ve annelerinden serolojik çalışma için kan örneklemiştir. Yaşları 2-6 ay arasında olan bu buzağılara ait gaita örnekleri ELISA yöntemi ile yapılan tetkiklerinde %0,54 (1/184) pozitiflik bildirmişlerdir. Saklı (2017) ise Konya ve Afyon çevresindeki bölgelerden ishali buzağılarda BCoV yaygınlığını inceledikleri çalışmalarında RT-PCR ve hızlı tanı kiti ile 96 adet dışkı örneğinden 13'ü (%13,54) BCoV yönünden pozitif olarak belirlenmiştir. Aksoy ve ark. (2021) Çankırı, Kırıkkale, Kırşehir, Yozgat, Çorum ve Ankara illerinde ishali buzağıda RT-PCR ile yaptıkları çalışmada BCoV pozitif %37,27 (41/110) belirlenmiştir. Temizkan ve Alkan, (2021) çalışmalarında Türkiye'nin 15 farklı yerleşim biriminden yaptıkları örneklemede coronavirusun prevalansını %21,9 (9/41) olarak tespit etmişlerdir. Pestil ve ark. (2016) tarafından İstanbul, Tekirdağ, Kırklareli ve Kocaeli illerinden topladıkları örneklerde coronavirus için pozitifliği %2 (2/100) olarak bildirmektedir.

ELISA tekniği ile yapılan mevcut çalışmada elde edilen %5,32 pozitiflik (Tablo 2) oranı, Yavru ve ark. (2016) bildirdikleri verilerden (%0,54) yüksek görülmektedir. Ancak elde edilen antikor düzeyleri iki aydan yaşlı bireylerin BCoV'u daha erken yaşta geçirmiş olabilecekleri şeklinde yorumlamışlardır. Bu çalışmada örneklenen hayvanların çoğunluğu 1 aydan küçük buzağıları kapsadığından bu görüş ile uyumlu ve destekler mahiyette olduğu görülmektedir.

Ülkemizde BCoV'a yönelik çalışmalar daha çok bir il veya bir bölgeyi kapsamakta olup farklı sayıda örnekleme ile yapılan çalışmalarda değişik teşhis (SNT, ELISA, Hızlı test kiti...) teknikler kullanılmıştır. Yaptığımız çalışmada elde edilen coronavirus antijen pozitifliği (%5,32) önceden yapılmış olan araştırmalardan bazılarının bildirdikleri %37,27 (Aksoy ve ark., 2021), %37,1 (Hasöksüz ve ark.,

2005), %21,9 (Temizkan ve Alkan, 2021), %18 (Alkan, 1998), %13,56 (Saklı, 2017), %13,4 (Ok ve ark., 2009), %13 (Eskiizmirli ve ark., 2001) değerlerden oldukça düşük olduğu görülmektedir. Öte yandan diğer araştırmacıların elde ettiği; %1 (Erdoğan ve ark., 2003), %1 (Gumusova ve ark., 2007), %1,12 (Çabalar ve ark., 2007), %2 (Pestil ve ark., 2016), %3.18 (Hasırcıoğlu, 2005) sonuçlardan yüksek olarak görülmekte ise de yakın değerler olduğu gözlemlenmektedir. Mevcut çalışmada elde edilen verinin ve diğer çalışmalarda tespit edilen oranların bu şekilde farklı olması çeşitli faktörler ile açıklanabilir. Bu faktörler arasında örnekleme yapıldığı bölgelerin farklı olması, o bölgenin iklim, coğrafik konum ve bu bölgelerdeki hayvancılık yetiştirme tarzının birbirinden oldukça farklı olmasına yanında kullanılan teşhis yöntemlerinin de hassasiyetinin farklılığına bağlanabilir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuç farklı yörelerde coronavirus yaygınlığının birbirinden çok farklı olduğuna işaret etmektedir. Türkiye'nin değişik illerinde bulunan kamuya ait işletmelerden temin edilen örnekler ile yapılan bir çalışmada, yetiştiricilik tarzları aynı olmasına rağmen ayrı bölgelerdeki illerden olması dışında çok az bir fark bulunan bu işletmelerde coronavirus farklı oranlarda tespit edilmiştir (Alkan, 1998). Yine farklı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda dışkı örneklerini Türkiye'nin birden çok farklı yerleşim biriminden sağlarken (Eskiizmirli ve ark., 2001; Gumusova ve ark., 2007; Temizkan ve Alkan, 2021), bazı araştırmacılar; Hasöksüz ve ark. (2005) Ege bölgesinden, Pestil ve ark. (2016) İstanbul, Tekirdağ, Kırklareli ve Kocaeli, Aksoy ve ark. (2021) Çankırı, Kırıkkale, Kırşehir, Yozgat, Çorum ve Ankara, Saklı (2017) Konya ve Afyon yöreleri gibi birkaç ilden, diğer çalışmalar ise; Erdoğan ve ark. (2003) Kars, Çabalar ve ark. (2007) Van, Yavru ve ark. (2016) Burdur, Hasırcıoğlu (2005) Malatya, Ok ve ark. (2009) Konya bölgesi gibi daha dar bir alandan (bizim çalışmamızda da olduğu gibi) örnekleme yapmışlardır ve farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Bu veriler görüşümüzü desteklemektedir.

Bu çalışmanın planlama aşamasında ve çalışmanın sonuçlandığı günümüze kadar olan süre içinde yapılmış olan literatür tarama çalışmalarında Şanlıurfa yöresinde yapılmış olan ve coronavirus çalışmış olan bir araştırmaya ulaşılmıştır. Alkan (1998) Şanlıurfa il sınırları içinde bulunan bir kamuya ait işletmeden 6 adet ishali buzağıdan örnekleme yapmış ve yaptığı tetkiklerde örneklerin tamamının negatif olduğunu tespit etmiştir. Bu bağlamda yapılan çalışmanın yöreye yönelik değerli bir bilgi kaynağı olacağı kanısına varılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçların Alkan (1998) verilerinden yüksek oranlarda bulunduğu gözlenmektedir. Bu durum her iki örnekleme yapılan işletmelerin farklı karaktere sahip olmasının yanında bu çalışmada

örneklene buzağı sayısının fazla olması ya da günümüzde bölgede enterik vakalarında coronavirusların etkinliğini artırmış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Bovine coronavirus ishal etkenleri olup klinik enfeksiyonları genellikle genç hayvanlarda görülmektedir. Dünyada yapılmış çalışmalar göstermektedir ki BCoV'un neden olduğu buzağı ishalleri yaşamın ilk bir ayında yaygın görülmektedir. Radostits (2007) BCoV enfeksiyonlarının genellikle 5-21 günler arasında görüldüğünü bildirmektedir. Garcia ve ark. (2000) İspanya'da ishalleri buzağılarda çeşitli enteropatojenlerin yaygınlığını inceledikleri çalışmalarında yaş gruplarına göre pozitiflik oranlarını BCoV için sırasıyla 1-7 günlük buzağılarda %26,67 (8/30), 8-14 günlüklerde %3,85 (1/26), 15-21 günlüklerde %4,35 (1/23), 22-30 günlük buzağılarda ise %7,14 (1/14) olarak bildirmişlerdir. Al Mawly ve ark. (2015) Yeni Zelanda'da süt besisi çiftliklerindeki 1283 adet ishalleri buzağılarda ELISA ile enteropatojenlerin varlığını belirledikleri çalışmada, yaş gruplarına göre pozitiflik oranlarını BCoV için 1-5 günlük buzağılarda %5,4, 9-21 günlük buzağılarda %6,1 olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada yaş gruplarına göre pozitiflik; 1-7 günlük buzağılar için %20,0 (1/5), 8-14 günlükler için %0,0, 15-21 günlükler için %0,0, 22-30 günlük buzağılar için ise %7,02 (4/57), 31-60 günlük %0,0 (0/15) ve 60-90 günlük buzağılar için ise %0,0 (0/2) olarak belirlenmiştir (Tablo 4). Bu veriler Garcia ve ark. (2000) ile kıyaslandığında elde edilen değerlerin 1-7 yaş grubunda oldukça yakın olmasına rağmen diğer yaş gruplarından ise oldukça düşük olduğu, Al Mawly ve ark. (2015) 1-7 günlük pozitiflerin daha yüksek iken aksine 8-14 günlük veriler ise düşük olarak görülmektedir. Bu durum bu çalışmada coronavirus pozitifliğin diğer çalışmalara göre oldukça düşük olması ve örnekleme yaptığımız buzağıların ekseri 21-30 günlük olması etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca çalışmalarda yeni doğmuş buzağıların yaşamlarının ilk haftasında enfeksiyona karşı oldukça duyarlı oldukları vurgulanmış olup BCoV ile enfekte olan buzağıların ortalama yaşlarını Alkan (1998) 13 gün olarak tespit ederken, Saklı (2017) ise 1-30 günlük ishal semptomları gösteren buzağılardan örnekleme yapmış ve dışkı örneklerinde BCoV varlığı tespit edilen buzağıların ortalama yaşlarının 14,5 gün, Coura ve ark. (2015) ise 13,8 gün, Hasircioğlu (2005) Antijen tespit edilen iki buzağının yaş ortalamasını 7,5 gün olduğunu belirlemiştir. Bu çalışmada 1 günden 2 aya kadar yaşlara sahip BCoV yönünden pozitif olarak tespit edilen buzağıların ortalama yaşları daha önce hayvanların yaş ortalamasını inceleyen diğer araştırmacıların (Alkan, 1998; Coura ve ark., 2015; Erdoğan ve ark., 2003; Garcia ve ark., 2000; Hasircioğlu, 2005; Saklı, 2017) sonuçlarıyla karşılaştırıldığında bu çalışmada

elde edile 23,4 yaş (Tablo 5) ortalamasının daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni örnekleme yapılan buzağıların diğer faktörler ile birlikte yaş gruplarının sayısal dağılımının da etkili olabileceği düşünülmüştür. Tablo 2 incelendiğinde; bu çalışmada toplanan örneklerin büyük bir çoğunluğu (57/94) 21-30 günlük buzağılardan oluşmaktadır ve pozitiflik buzağı sayısının 4/5 (%80) bu yaş grubundadır. Buna rağmen 0-7 günlük buzağıların örnek sayısı diğer yaş gruplarına göre daha az olsa da BCoV için en yüksek pozitiflik (%20) bu yaş grubunda tespit edilmesi yukarıda söz edilen çalışmaların verilerini desteklemektedir.

Alkan (1998) bu durumun buzağıların annelerinden aldıkları kolostrumla ilgili olabileceğini ifade etmiştir. Alkan (1998) ortalama enfeksiyon yaşının etkilendiği en önemli etkenlerden birisinin maternal immünite olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada örnek alınan buzağıların hepsinin annelerinden kolostrum aldığı yetiştiricilerin beyanı ile belirlenmiştir. Bu da çalışmada örnek alınan buzağıların annelerinden aldıkları kolostrumun maternal immüniteyi uyardığı ve çalışmada belirtilen yaşlara göre pozitiflik oranlarına etki ettiğini göstermiştir.

Mevcut çalışmada Şanlıurfa yöresinde BCoV prevalansı düşük olarak belirlenmiş ancak gerekli tedbirlerin alınmaması sonucunda bu oran yükselerek önemli kayıplara neden olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen prevalansın daha da düşürülmesi veya yükselmesini engellemenin aşılama ile mümkün olabileceğini düşünmekteyiz. BCoV aşısı buzağılara doğum esnasında uygulanırsa bile yavrular koruma düzeyinde antikor oluşturmadan bu enfeksiyona yakalandıklarını bildiren bilim insanları (Hodnik ve ark., 2021; Kohara ve Tsunemitsu, 2000; Vlasova ve Saif, 2021) annelerin aşılmasını önermektedirler. Alkan ve ark. (2004) da Rotavirus ve Coronavirus aşısı uygulanan annelerin buzağılarının hastalanma oranları %30 iken aşı uygulanmayan annelerin doğan buzağılarının hastalanma oranlarının daha yüksek olduğunu (%54,5) bildirdikleri bu çalışma görüşümüzü desteklemektedir.

Bu bağlamda, yenidoğanların BCoV enfeksiyonuna karşı korunmaları sağlamak için, gerekli bakım ve beslemenin yapılmasının yanında, hijyen şartlarının sağlanması, yenidoğanların kolostrum alması ve işletmelerde aşılama programlarının uygulamaya konulması önemlidir.

### Çıkar çatışması

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

## Etik izin

Bu çalışma, DOLLVET A.Ş. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (BOLLVET-HADYEK) 10.06.2016 tarih ve 2016/21 nolu etik kurul izni ile yapılmıştır.

## Finansal destek

Bu çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Projeler Araştırma Koordinatörlüğü (HÜBAK) tarafından 16161 proje numarası ile desteklenmiştir.

## Benzerlik Oranı

Bu çalışma, "Şanlıurfa İlindeki İshalli Buzağılarda Coronavirusların ELISA Yöntemi ile Araştırılması" isimli tez çalışmasından özetlenmiş olup tezin benzerlik endeksinin %5 olduğunu beyan ederiz.

## Açıklama

Bu çalışma aynı isimli yüksek lisans tezinden özetlenmiş "1. Uluslararası İğdir Multi Disipliner Çalışmalar Kongresi" isimli kongrede de tam metin olarak yayınlanmıştır.

## Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: RA, İÖ  
Tasarım: RA, İÖ  
Denetleme/Danışmanlık: İÖ  
Veri Toplama ve/veya İşleme: RA, İÖ  
Analiz ve/veya Yorum: RA, İÖ  
Kaynak Taraması: RA, İÖ  
Makalenin Yazımı: RA, İÖ  
Eleştirel İnceleme: İÖ

## Kaynaklar

Abraham G, Roeder PL, Zewdu R. 1992: Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian dairy calves. *Trop Anim Hlth Prod*, 24, 74-80.

Aksoy E, Kara E, Yağcı BB, Azkur AK, 2021: Investigation of Bovine Coronavirus and Bovine Rotavirus in Calves with Neonatal Diarrhea in Kırıkkale and Surrounding Provinces. *MAKU J. Health Sci. Inst*, 9 (3), 38-46.

Al M, Balıkcı E, 2012: Neonatal İshalli Buzağılarda Rotavirus, Coronavirus, E. coli K99 ve Cryptosporidium parvum'un Hızlı Test Kitleri ile Teşhisi ve Enteropatojen ile Maternal İmmünite İlişkisi. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 26 (2), 73- 78.

Al Mawly J, Grinberg A, Prattley D, Moffat J, French N, 2015: Prevalence of endemic enteropathogens of calves in New Zealand dairy farms. *New Zealand Vet J*, 63 (3), 147-152.

Alkan F, 1998: Buzağı İshallerinde Rotavirus ve Corona Virusların Rolü. *AÜ Vet Fak Derg* 45 (1), 29-37.

Alkan F, Burgu İ, Şahna KC, Çokçalışkan C, 2004: Yenidoğan buzağı ishallerine karşı ticari aşı ile aşılanan sığırlardan doğan yavrularda pasif bağışıklık düzeyi. *AÜ Vet Fak Derg*, 51, 47-53.

Amoroso MG, Lucifora G, Uberti BD, Serra F, De Luca G, Borriello G, De Domenico A, Brandi S, Cuomo MC, Bove F, Riccardi MG, Galiero G, Fusco G, 2020: Fatal Interstitial Pneumonia Associated with Bovine Coronavirus in Cows from Southern Italy. *Viruses*, 12, 1331; doi:10.3390/v12111331

Athanassious R, Marsolais G, Assaf R. 1994: Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Quebec Evaluation of three diagnostic methods. *Can Vet J*, 35, 163-169.

Atlı K, Yıldırım Y, Hasircioğlu S, Bulu O, Avcı O, 2018: Buzağılarda İshale Neden Olan Başlıca Viral Etkenler. *Göller Bölgesi Aylık Hakemli Ekonomi ve Kültür Dergisi*, 5 (6), 70-74.

Azizzadeh M, Shooroki HF, Kamalabadi AS, Stevenson MA, 2012: Factors affecting calf mortality in Iranian Holstein dairy herds. *Prev Vet Med*, 104, 335-340.

Baker SC, 2008: Coronaviruses: Molecular Biology. In Desk Encyclopedia of General Virology, Mahy BWJ, van Regenmortel MHV (ed). 445-453, Academic Press, Elsevier. California, USA.

Bok M, Miño S, Rodriguez D, Badaracco A, Nuñez I, Souza SP, Bilbao G, Louge Uriarte E, Galarza R, Vega C, Odeon A, Saif LJ, Parreño V, 2015: Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994-2010. *Vet Microbiol*, 7122, 9.

Brunauer M, Roch FF, Conrady B, 2021: Prevalence of Worldwide Neonatal Calf Diarrhoea Caused by Bovine Rotavirus in Combination with Bovine Coronavirus, Escherichia coli K99 and Cryptosporidium spp.: A Meta-Analysis. *Animals*, 11 (4), 1014 (1-23). Doi: 10.3390/ani11041014

Caffarena RD, Casaux ML, Schild CO, Fraga M, Castells M, Colina R, Maya L, Corbellini LG, Riet-Correa F, Giannitti F, 2021: Causes of neonatal calf diarrhea and mortality in pasture-based dairy herds in Uruguay: a farm-matched case-control study. *Braz J Microbiol*, 52, 977-988. doi: 10.1007/s42770-021-00440-3

Chae JB, Kim HC, Kang JG, Choi KS, Chae JS, Yu DH, Park BK, Oh YS, HJ, Park J, 2021: The prevalence of causative agents of calf diarrhea in Korean native calves. *J Anim Sci Technol*, 63 (4), 864-871. doi: 10.5187/jast.2021.e63

Coura FM, Freitas MD, Ribeiro J, De Leme RA, De Souza C, Alfieri A, Heinemann MB, 2015: Longitudinal study of Salmonella spp. Diarrheagenic Escherichia coli, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. *Trop Anim Health Prod*, 47 (1), 3-11.

Çabalar M, Kaya A, Arslan S, 2007: Yeni doğan buzağuların ishal olgularında rotavirus ve coronavirus araştırılması. *Vet Bil Derg*, 23 (3-4), 103-106.

De la Fuente R, Garcia A, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Luzón M, Cid D, García S, Orden JA, Gómez-Bautista M, 1998: Proportional morbidityrates of enteropathogens

- among diarrheic dairy calves in central Spain. *Prev Vet Med*, 36, 145-152.
- Debelo M, Abdela H, Tesfaye A, Tiruneh A, Mekonnen G, Asefa Z, Moje N, 2021: Prevalence of Bovine Rotavirus and Coronavirus in Neonatal Calves in Dairy Farms of Addis Ababa, Ethiopia: Preliminary Study. *BioMed Res Int*, 2021, Article ID 5778455. doi: 10.1155/2021/5778455
- Decaro N, Mari V, Desario C, Campolo M, Elia G, Martella V, Greco G, Cirone F, Colaianni ML, Cordioli P, Buonavoglia C, 2008: Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. *Vet Microbiol*, 126 (1-3), 30-39.
- Erdoğan HM, Ünver A, Güneş V, Çitil M, 2003: Kars Yöresindeki Neonatal Buzağlarda Rotavirus ve Coronavirus Yaygınlığı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 9 (1), 65-68.
- Eskiizmirli SN, Öncel T, Beyazıt A, Mısırlıoğlu OZ, 2001: Türkiye'nin değişik illerindeki ishallerde buzağlarda rotavirus, coronavirus ve cryptosporidiosis yayılışı. *Vet Hek Mikrobiyal Derg*, 2, 35-42.
- Garcia A, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Orden JA, Cid D, Sanz R, Gómez-Bautista M, de la Fuente R, 2000: Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, 23, 175-183.
- Gomez DE, Weese JS, 2017: Viral enteritis in calves. *Can Vet J*, 58, 1267-1274.
- Gulliksen SM, Jor E, Lie KI, Hamnes IS, Løken T, Akerstedt J, Osteras O, 2009: Enteropathogens and risk factors for diarrhea in norwegian dairy calves. *J Dairy Sci*, 92, 5057-5066.
- Gumusova SO, Yazici Z, Albayrak H, Meral Y, 2007: Rotavirus and coronavirus prevalence in healthy calves and calves with diarrhea. *Medycyna Wet*, 63, 62-64.
- Hasırcıoğlu S. 2005: Buzağlarda Enterik Bovine Coronavirus Enfeksiyonlarının Araştırılması ve Epidemiyolojide Klinik Olarak Sağlıklı Sığırların Rolü. Doktora Tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Hasöksüz M, Kayar A, Dodurka T, Ilgaz A, 2005: Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in northwestern Turkey. *Acta Vet Hung* 53 (1), 137-146.
- Hodnik JJ, Ježek J, Starič J, 2020: Coronaviruses in cattle. *Trop Anim Health Prod*, 52, 2809-2816. doi: 10.1007/s11250-020-02354-y
- House TA, 1978: Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agent of animals. *J Am VetMed Assoc*, 173, 573-576.
- Izzo MM, Kirkland PD, Mohler VL, Perkins NR, Gunn AA, House JK, 2011: Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust Vet J*, 89 (5), 167-173.
- Kohara J, Tsunemitsu H. 2000: Correlation between maternal serum antibodies and protection against bovine rotavirus diarrhea in calves. *J Vet Med Sci*, 62, 219-221.
- Lai MMC, Perlman S, Anderson LJ, 2007: Coronaviridae. In Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; pp.1305-1335.
- Lotfollahzadeh S, Madadgar O, Mohebbi MR, Dezfouli MRM, Watson DG, 2020: Bovine coronavirus in neonatal calf diarrhoea in Iran. *Vet Med Sci*, 6 (4), 686-694. doi: 10.1002/vms3.277
- Ok M, Güler L, Turgut K, Ok U, Sen I, Gündüz IK, Birdane MF, Güzelbekteş H. 2009: The Studies on the Aetiology of Diarrhoea in Neonatal Calves and Determination of Virulence Gene Markers of Escherichia coli Strains by Multiplex PCR. *Zoonoses Public Health*, 56, 94-101.
- Park SJ, Jeong C, Yoon SS, Choy HE, Saif LJ, Park SH, Kim YJ, Jeong JH, Park SI, Kim HH, Lee BJ, Cho HS, Kim SK, Kang MI, Cho KO, 2006: Detection and Characterization of Bovine Coronaviruses in Fecal Specimens of Adult Cattle with Diarrhea during the Warmer Seasons. *J Clin Microbiol*, 44, 3178-3188.
- Perlman S, Netland J, 2009: Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 7 (6), 439-450.
- Pestil Z, Gülyaz V, Hasöksüz M, 2016: Marmara Bölgesinde Yeni Doğan Buzağı İshallerinde Bovine Coronavirusların Saptanması ve Patojenite Çalışması. *Etilik Vet Mikrobiyal Derg*, 27 (1), 16-20.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, 2007: *Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats*. Philadelphia Saunders, p. 673-762.
- Saif LJ, 2010: Bovine respiratory coronavirus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26 (2), 349-64. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.005.
- Saklı GU, 2017: İshallerde Buzağı Dışkılarında Sığır Coronavirusu ve Sığır Rotavirusunun Hızlı Tanı Kiti ve RT-PCR ile Araştırılması. Doktora Tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Temizkan SS, Alkan F, 2021: Bovine coronavirus infections in Turkey: molecular analysis of the full-length spike gene sequences of viruses from digestive and respiratory infections. *Archives of Virology*, 166 (9), 2461-2468. doi: 10.1007/s00705-021-05147-2
- Vlasova AN, Saif LJ, 2021: Bovine Coronavirus and the Associated Diseases. *Front Vet Sci*, 8: 643220. doi: 10.3389/fvets.2021.643220
- Yavru S, Yapıcı O, Kale M, Sahinduran S, Pehlivanoglu F, Albay MK, Avci O, 2006: Bovine coronavirus (BoCV) infection in calves with diarrhoea and their dams. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44, 01-07.

\*Yazışma Adresi: İrfan ÖZGÜNLÜK

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

e-mail: ozgunluk@harran.edu.tr

## Poisoning of sheep by Babrik Plant (*Cionura erecta* (L.) Griseb.) in Şanlıurfa / Turkey

Kasım TAKIM<sup>1,a</sup>, Hasan AKAN<sup>2,b,\*</sup>, Hikmet DİNÇ<sup>3,c</sup>, Abdullah GÖKMEN<sup>4,d</sup>

<sup>1</sup>Harran University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Şanlıurfa, Turkey.

<sup>2</sup>Harran University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Şanlıurfa, Turkey.

<sup>3</sup>Gaziantep Islam Science and Technology University, Medical Faculty, Gaziantep, Turkey.

<sup>4</sup>Şanlıurfa Haliliye District Directorate of Agriculture Animal Health Unit, Şanlıurfa, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-4631-1982, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-3033-4349, <sup>c</sup>ORCID: 0000-0003-1823-1790, <sup>d</sup>ORCID: 0000-0003-2120-4128

Geliş Tarihi: 21.02.2022

Kabul Tarihi: 25.04.2022

**Abstract:** *Cionura erecta* (L.) Griseb., belongs to the Apocynaceae family, is one of the poison plants in Turkey, widely grown in the Mediterranean region, and known as Babrik in Turkey. In south east Anatolia, the vernacular name of the plant is Halava and Kulf. In the Mello village of Haliliye, district of Şanlıurfa, plant poisoning in sheep has been reported. This plant poisoned 120 sheep in the herd of 300 sheep in Mello village of Haliliye district of Şanlıurfa. In 50 seriously ill sheep, coordination disorder-weakness-difficulty in breathing, and coma were observed. A self-employed veterinarian responded to toxication first by giving electrolyte supplementation and medicated (antihistamine) serum; 37 of these animals died. Then, veterinarians affiliated with the provincial and district agriculture directorate intervened and the remains were saved. Necropsy was also performed on deceased animals. Babrik was observed in the gastrointestinal contents with intense deformation in the rumen and intestinal mucosa. Phytochemical studies were also compiled to predict plant toxicity in this case report.

**Keywords:** Babrik, *Cionura erecta*, Poisoning, Sheep.

### Şanlıurfa (Türkiye)'da Koyunlarda Babrik Bitkisi zehirlenmesi (*Cionura erecta* (L.) Griseb)

**Özet:** Apocynaceae familyasına ait *Cionura erecta* (L.) Griseb., Türkiye'de Akdeniz bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen ve Babrik olarak bilinen zehirli bitkilerden biridir. Güneydoğu Anadolu'da bitkinin yerel adı Halava ve Kulf'tur. Şanlıurfa'nın Haliliye ilçesine bağlı Mello köyünde 300 koyunun olduğu sürüde bu bitkiden 120 koyunun zehirlendiği bildirildi. Ağır hasta olan 50 hayvanda; koordinasyon bozukluğu-halsizlik-nefes almada güçlük ve koma hali görülmüştür. İlk müdahale serbest veteriner hekim tarafından, elektrolit takviyesi ve toksikasyon sağaltımı için ilaçlı (antihistaminik) serum vermek suretiyle yapılmış, akut toksikasyon belirtileri gösteren bu hayvanlardan 37'si telef olmuştur. Daha sonra il ve ilçe tarım müdürlüğüne bağlı veteriner hekimler müdahale edip geriye kalan hayvanlar kurtarılmıştır. Ölen hayvanlarda nekropsi yapılmış, rumen ve bağırsak mukozalarında yoğun deformasyonla birlikte mide bağırsak içeriğinde bu bitkiden büyük miktarda bulunduğu görülmüştür. Bu vaka raporunda bitkinin toksikasyonunu tahmin etmek amacıyla fitokimyasal çalışmalar da derlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Babrik, *Cionura erecta*, Koyun, Zehirlenme.

### Introduction

The plant, *Cionura erecta* (L.) Griseb., which contains much poisonous milk juice, is widely grown in Turkey (Browicz, 1967; Browicz, 1978). The plant naturally spreads in the region from the eastern Mediterranean basin to Afghanistan. It is a widespread species in Turkey except for Central and North Eastern Anatolia (Yaltirik, 1967). It grows on conglomerate scree, limestone cliff's, fields, river beds, beaches and waste places from sea level to 100 (-1400) m (Browicz, 1978). The flowering time is between April and September.

*Cionura erecta* is taxonomically in the Apocynaceae family. The genus *Cionura* is represented by a single species in the world. The Turkish names of plant are Babrik, Panzehir otu, Bodur otu and Dağ sarmaşığı (Polat and Selvi, 2020).

Its local names in Şanlıurfa are Halava (Arabic) and Kulf (Kurdish) (Figure 1). It has a vast population in Şanlıurfa.

The poisonous properties of *Cionura erecta* (L.) Griseb. has been known since antiquity. It has been used to exterminate harmful animals and the name "Apocynon" was given to this plant by Dioscorides to refer to that particular function (Baumann, 1996; Myriantopoulos et al., 2007; Öztürk et al., 2008)

The whole part of the plant is toxic. The phytochemical studies on the plant determined the harmful effect vary according to the features of the plant. It is known that anethole (80.6%), defined in the essential oil of plant leaves, is a poisonous and irritating compound in large quantities (Mirza and Navaei, 2009). Also, in another study mentioned,



safranal (16.8%) was determined as the main component in the plant's essential oil. As a result of the literature review, it has been stated that the compound showing the toxic effect is safranal (Myriantopoulos et al, 2007; Öztürk et al., 2008).

Thus, it is thought that the *Cionura erecta* causes the animal poisoning cases seen in various regions of Turkey. Since it is a poisonous plant, goats and sheep do not approach it (Öztürk et al., 2008).

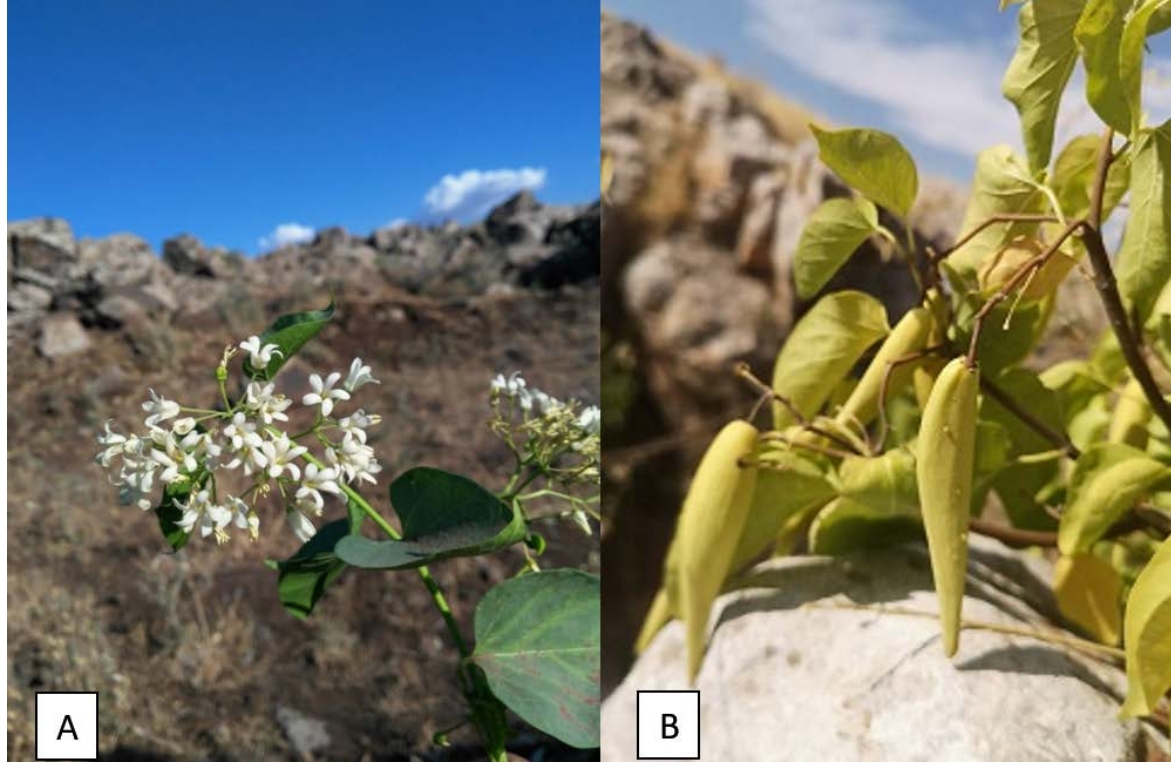


Figure 1. General view of *Cionura erecta* in field. A) Flowers, B) Fruits



Figure 2. A) Sheep poisoned by *Cionura erecta* and B) Their treatment procedures by veterinarians.

### Case History

The poisoning case took place in the evening time in the stream bed called Zilasun. We made investigations in the Zilasun creek bed where the case took place. When we arrived at the area after a phone call, we saw dead sheep (Figure 2) with signs of enterotoxemia in the herd of about 300 heads (İvesi Sarıbaş breed). Intoxication symptoms appeared around 21.00 in the evening. Coordination

disorder-weakness-difficulty in breathing and coma were observed in sick animals. The treatment administered by the self-employed veterinarian during this period did not yield any results, and these animals, which showed signs of acute toxicity, died. In this case, the number of animals that perished is 37 heads (two male, 35 female). It was observed that there was a large amount of poisonous plant, *Cionura erecta*, in the gastrointestinal contents of



the necropsy animals, with intense deformation in the rumen and intestinal mucosa.

The scene investigation determined that the vegetation was dry as usual for the season, but the plant causing the poisoning was still wet, and fruit parts were consumed mostly. Sheep do not usually eat this plant. We think the animals eat this plant because they are starving. The animal owner did not want to give information. Still, we guess hungry animals are more sensitive to poisonous plants if they consume large amounts. So the animals should be given grass and hay before they are released to the pasture. When signs of poisoning began, the herd should be immediately removed from the area and not allowed to drink water. However, we think that there is no herd follow-up and that the animal owner does not have enough information about not drinking water.

No abortion cases were observed in the herd.

We could not report further details due to the many affected animals.

Anamnesis information, signs of poisoning, and the destruction of the plant toxin in the stomach, and the necropsy results proved the acute intoxication caused by this plant.

On the morning of the incident, after the animal owner reported that similar symptoms had started in the rest of the herd, Haliliye District authorized veterinarians examined the pack. A treatment plan was prepared and implemented in consultation with self-employed veterinarian experts. They gave liquid oil to all animals. Antihistaminic-5% dextrose-calcium-B complex vitamin-sodium bicarbonate is applied. Animals without enterotoxemia symptoms (swelling) are supported with atropine. Additionally, non-pregnant animals were administered cortisone. After this treatment, no death was reported.

**Locality of investigated plant:** C7 Şanlıurfa: Haliliye, Mello Village, 37°14'15.8"N 38°52'31.8"E, 600-700 m, 13.10.2020, H.Akan 6094&K.Takım. It was deposited in HARRAN herbarium in Harran University.

## Discussion and Conclusion

The poisonous properties of *Cionura erecta* have been known since ancient times. It has been traditionally used to kill pest animals (Öztürk et al., 2008).

*C. erecta* plant was extracted with the Clevenger device by collecting the leaves, stems, and fruits. Gas chromatography (GC) added to mass spectrometry (GC-MS) was used to define the essential oil composition. In this study, a total of 23 major chemical compounds were identified. Among these compounds, cedron-9-one and eugenol were found at the highest levels (Moradian et al., 2018).

Recently, when the phytochemical studies on the plant are examined, the components thought to be responsible for the toxic effect vary according to the parts of the plant. It is known that anethole (80.6%) detected in the essential oil of plant leaves is a poisonous and irritating compound in large amounts (Mirza and Navaei, 2009).

In addition, in another study mentioned, safranal (16.8%) was determined as the main component in the plant's essential oil. As a result of the literature review, it was found that safranal has cytotoxic effects. The main components of the leaves were found to be 80.6% (E)-anethole and 10.3% neophytadiene. The main features obtained from flowers were methyl hexadecanoate (22%), tetradecanol (13.3%), 2-methoxy-benzaldehyde (9.0%), and decanol (8.6%) (3). In a similar study, 72 components representing 91.3% of the total were identified in the essential oil of the plant (Mirza and Navaei, 2009; Myriantopoulos et al., 2007).

The root essential oil and methanol extract of *C. erecta* were investigated for their larvicidal and repellent activities against *Anopheles stephensi* under laboratory conditions. 320 ppm essential oil and 1280 ppm methanolic extract was found to have 100% mortality. In this study, 19 compounds were identified in essential oil. The main components were found to be cedren-9-one (7.89%), alpha cachelinol (5.67%), eugenol (4.02%), and alpha muurolene (3.58%) (Mozaffari et al., 2014).

According to the information received from the field, it is stated that such cases have occurred before, but only a few animals have been affected, and the health status of the animals can be restored by treating the affected animals with sugar water. In addition, according to the public experience, it has been reported that both the leaf and fruit parts of this plant adversely affect the animals, but the fruit part has a faster and more toxic effect.

The animals we got results responded to the treatment because they consumed the plant less and did not show signs of acute enterotoxemia. Therefore, existing observation and traditional experience support each other.

Hungry animals are more susceptible to poisonous plants and consume large amounts, so animals should be given grass and hay before being released into the pasture. When signs of poisoning begin, the herd should be immediately removed from the area and not be allowed to drink water because water will accelerate the absorption of toxins. More detailed analyzes are needed to determine whether this case originated from the *C. erecta*.

It has not been reported how many days the animals recover after treatment. The blood samples

taken at the beginning were not kept as it was not considered to be a forensic case.

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

### Ethical Approval

This study is not subject to HADYEK's permission in accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees".

### Funding

This work is not supported by any Project.

### Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 9% as stated in the report uploaded to the system.

### Author Contributions

Motivation/Concept: HA, KT  
Design: HD, KT, HA  
Control/Supervision: AG, KT  
Data Collection and / or Processing: HA, KT, AG  
Analysis and / or Interpretation: HA, KT  
Literature Review: HD, KT  
Writing the Article: HD, HA  
Critical Review: HA, KT, HD

### References

- Browicz K, 1967: Genus *Cionura* Grisebach – Distribution, history and application. *Arboretum Kórnickie*, 12: 5–32.
- Browicz K, 1978: *Cionura erecta*. In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Davis PH (ed). Edinburgh University Press, Edinburgh, 6, pp. 173–174.
- Mirza M, Navaei MN, 2009: Chemical composition of the essential oils extracted from the leaf and flowers of *Marsdenia erecta* (L.) R. Br. in Iran. *J Essent Oil-Bear Plants*, 12, 87-91.
- Moradian FJF, Taheri Ak, Heidari SKA, 2018: Identification and Introduction of Chemical Compounds in Essential Oil of *Cionura erecta* Shrub Species (Case Study: Chahartagh Forest Reserve-Chahar Mahal and Bakhtiari Province). *Ecology of Iranian Forest*, 6, 62–71.
- Mozaffari E, Abai MR, Khanavi M, et al., 2014: Chemical composition, larvicidal and repellency properties of *Cionura erecta* (L.) Griseb. against malaria vector, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *J Arthropod Borne Dis*, 8, 147.
- Myriantopoulos V, Fokialakis N, Melliou E, et al., 2007: Chemical Composition of The Essential Oil of *Cionura erecta* (Asclepiadaceae) Inflorescences. *J Essent Oil Res*, 19, 266-268.
- Öztürk M, Uysal I, Gücel S, et al., 2008: Ethnoecology of poisonous plants of Turkey and Northern Cyprus. *Pak J Bot*, 40, 1359-1386.
- Polat R, Selvi S, 2020: A Research on plant taxa with invasive character in Bingöl (City centre) and surroundings. *BioDiCon*, 13, 332-350.
- \*Correspondencer: Hasan AKAN  
Harran University, Faculty of Arts and Sciences,  
Department of Biology, Şanlıurfa, Turkey.  
e-mail: hakan@harran.edu.tr

## Approach to Acute Phase Reactions in the Aspects of Pathology and General Situation in Turkey

**Belma DAYI<sup>1,a,\*</sup>, Alper SEVİMLİ<sup>1,b</sup>**

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, 03200, Afyonkarahisar, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-9253-4012, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0003-0452-0129

Geliş Tarihi: 07.04.2022

Kabul Tarihi: 09.05.2022

**Abstract:** This review evaluates the importance of acute phase proteins (APP) and acute phase reaction (APR), which are accepted as sensitive biomarkers in diagnosing of animal diseases, both in general and pathological terms, with a particular emphasis on the situation in Turkey. Pathological examinations have been extensively used in studies investigating the APP and APR in veterinary medicine globally. In contrast, the number of studies and pathology involvement is limited in Turkey. For this reason, we conducted a qualitative and quantitative analysis of the studies in the world and in Turkey to emphasize the importance of the subject and increase awareness among the clinicians. The review is the first comprehensive report on the subject in Turkey and is supported by a regional map of the distribution of performed studies.

**Keywords:** Acute phase protein, Acute phase reaction, C-reactive protein, Haptoglobin, Secondary amyloidosis, Serum amyloid-A.

### Akut Faz Reaksiyonlarına Patoloji Açısından Yaklaşım ve Türkiye'deki Genel Durum

**Özet:** Bu derleme, hayvanlarda hastalıkların teşhisinde duyarlı biyobelirteçler olarak kabul edilen akut faz proteinleri (AFP) ve akut faz reaksiyonunun (AFY) hem genel hem de patolojik açıdan önemini Türkiye'deki duruma özel bir vurgu yaparak değerlendirmektedir. Patolojik incelemeler, dünya çapında veteriner hekimlik alanında AFP'leri ve AFY'yi araştıran çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna karşılık Türkiye'de, hem çalışma sayısı hem de patolojinin katılımı sınırlıdır. Bu nedenle konunun önemini vurgulamak ve klinisyenlerin farkındalığını arttırmak için dünyada ve Türkiye'de yapılan çalışmaların nitel ve nicel bir analizini yaptık. Bu derleme, Türkiye'de konuyla ilgili yapılan ilk kapsamlı çalışmadır ve yapılan çalışmaların dağılımının bölgesel bir haritası ile desteklenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Akut faz protein, Akut faz yanıt, C-reaktif protein, Haptoglobin, Sekonder amiloidozis, Serum amiloid A.

### Introduction

Acute phase reaction (APR) is a complex reaction induced by stimuli such as tissue damage, infection, trauma, neoplasia, or immunological disorders. This response includes many pathophysiological changes (Bochler & Slauson, 2002), is nonspecific, and can be observed in many conditions that cause tissue damage (Ceron et al., 2005). The most critical changes in APR are the synthesis and release of acute phase proteins (APP) (Ceciliani et al., 2002). Acute phase proteins are a group of blood proteins synthesized primarily by the liver during APR. Since their concentrations change during the APR, these proteins have been proposed as essential biomarkers for monitoring and protecting animal health (Ceron et al., 2005).

The primary purpose of our work was to evaluate APR both clinically and pathologically in the field of veterinary medicine in Turkey, give insight to researchers for new studies, and provide relevant information to veterinary practitioners. To emphasize the importance of the subject, a review of the studies carried out in the world and Turkey, with

their regional distributions, are presented. The references used in this study consisted of studies found by searching the terms "acute phase proteins in animals" and "acute phase proteins in Turkey" in PubMed and Google Scholar electronic databases between 2000-2022. The search for the former terms revealed 21,263 publications in PubMed and 17,900 publications in Google Scholar. A total of 169 animal studies were published in Turkey in the same period.

#### 1. Acute Phase Response

Local inflammation is the first response of the immune system to noxious stimuli. If the inflammatory reaction progresses, the organism activates a wide-ranging systemic response known as APR (Bochler & Slauson, 2002). Innate immunity is an effective system for preventing infections and initiating inflammatory reactions. Acute phase reaction, which is considered part of this immunity, covers all inflammation-related events, including metabolic, hematopoietic, neuroendocrine, and hepatic changes (Ceciliani et al., 2002).

### 1.1. Acute Phase Reaction and the Inflammatory Process

Acute phase reaction, which occurs during acute and chronic inflammatory reactions involving many organs, denotes numerous metabolic changes (Murata et al., 2004). Ensuring the continuity of the APR depends on the recruitment of neutrophils, lymphocytes, and macrophages to the inflamed area and the secretion of cytokines by activated endothelial cells and innate immunity cells (Bochler & Slauson, 2002; Ceciliani et al., 2002).

Cytokines, which act as intracellular and intercellular signaling molecules, are synthesized in increasing amounts in cells during the inflammatory reaction, and have numerous and complex effects such as activating APR and regulating APP synthesis in the body (Bochler & Slauson, 2002). The cytokines that regulate the synthesis and release of APP from the liver are called proinflammatory cytokines. These proinflammatory cytokines, which have numerous effects on the body, are interleukin-1 (IL-1), IL-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Bochler & Slauson, 2002). Various clinical and pathological changes, aiming to eliminate the harmful stimulus, maintain homeostasis, and support the healing process, occur during the APR (Kumar et al., 2014). Some of these changes are summarized below:

#### Synthesis of proinflammatory cytokines:

Tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-1, and IL-6 are synthesized and secreted by monocytes, macrophages, and other cells in the inflamed area. These cytokines can enter the circulation to initiate APR, which accompanying infection and inflammation (Kumar et al., 2014).

**Fever:** Pyrogenic substances stimulate leukocytes and other cells to produce cytokines, and ensure the release of proinflammatory cytokines. These cytokines increase the level of cyclooxygenase enzyme by stimulating the hypothalamus. Hypothalamus then induces the production of prostaglandins and neurotransmitters, and increases the body temperature (Kumar et al., 2014).

**Synthesis of APP:** Proinflammatory cytokines such as IL-1, TNF- $\alpha$ , and particularly IL-6 plays essential roles in the synthesis and increase of plasma APP concentrations (Kumar et al., 2014).

**Leukocytosis:** Leukocytosis is one of the significant manifestations of the APR (Ceciliani et al., 2002). Cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-1 increase the release of leukocytes from the bone marrow. Additionally, these cytokines, activate the endothelium and increase the expression of adhesion molecules which promotes leukocyte adhesion and migration (Kumar et al., 2014).

**2. Acute Phase Proteins:** Acute phase proteins are a group of blood proteins identified in the early 1900s as early reactants for diagnosing infectious

diseases and are considered essential biomarkers (Murata et al., 2004). These proteins regulate inflammation via either their proinflammatory or antiinflammatory features (Ceron et al., 2005). The synthesized APPs and their concentrations during the APR vary according to the type of noxious stimulus and animal species (Ceciliani et al., 2012). With the formation of the inflammatory reaction, APPs rapidly enter the bloodstream. These proteins are generally absent or present only at deficient levels in plasma. During the APR, their synthesis in the liver increases, and they enter the circulation (Kumar et al., 2014).

### 2.1. Some Major Acute Phase Proteins

**2.1.1. Serum Amyloid A:** Serum amyloid A (SAA), with a molecular weight of 15 kDa, is a high-density lipoprotein-associated apolipoprotein (Ceron et al., 2005). High expression of SAA is thought to have a vital role in the pathogenesis of secondary amyloidosis (Bochler & Slauson, 2002). Conditions increasing the SAA concentration are presented in Table 1. As seen in the table 1, most studies investigating the SAA were performed in large ruminants, and increased SAA concentrations were observed mainly due to viral and parasitic infections.

**2.1.2. Haptoglobin:** Haptoglobin (Hp) is an  $\alpha 2$  globulin component capable of binding hemoglobin. With a molecular weight of 125kDa, Hp is one of the most critical APPs in ruminants (Eckersall, 2000). Trigger conditions leading to an increase in Hp concentration have mainly been detected in viral and bacterial infections of large ruminants and are summarized in Table 2.

**2.1.3 C-Reactive Protein:** C-reactive protein (CRP) is an APP that has been identified for the first time in the blood of people suffering from pneumonia (Kumar et al., 2014). C-reactive protein, a prominent APP in dogs, can facilitate diagnosis by demonstrating the presence and extent of inflammation (Nakamura et al., 2008). The conditions that lead to increased CRP concentration, which is used as an effective marker, especially in systemic inflammations, are presented in Table 3. As seen in this table, an increase in CRP concentration has been observed in various animal species, especially in dogs, in many triggering conditions such as infections and neoplasia.

### 2.2. The Importance of Acute Phase Proteins in Veterinary Medicine in Turkey

The search carried out with the "acute phase proteins in Turkey" revealed 5,930 publications in the Google Scholar database and 2,974 publications in the PubMed database. A total of 169 of these studies were performed on animals. The distribution of these studies by region is given in Figure 1. It was determined that five of these studies were reviews,

**Table 1.** Summary of triggering events leading to increased serum amyloid A concentration.

Animal	Triggering Event	Reference
Cat	FCoV/Kidney failure/Diabetes mellitus	(Tuna, 2015)
Dog	Parvovirus <i>Sarcoptes canis</i>	(Sahinduran et al., 2016) (Arslan and Kırmızıgül, 2020)
Cattle	<i>Escherichia coli</i> F5/Rotavirus/Coronavirus/ <i>Eimeria</i> spp.	(Balıkcı and Al, 2014)
	BVDV/BHV 1	(Sahinduran et al., 2017)
	CGB	(Issi et al., 2017)
	FMD	(Mallick et al., 2021)
	<i>Babesia bigemina</i> <i>Trichostrongylus</i> spp. Hydatid cysts	(Mohammadi et al., 2021) (Sevimli et al., 2015) (Sevimli et al., 2015)
Sheep	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Fasciola hepatica</i>	(Dinler et al., 2017) (Denizhan et al., 2019)
	Goat	<i>Trichuris</i> spp.+ <i>Trichostrongylidae</i> spp.+ <i>Fasciola</i> spp.
Horse	Endometritis	(Hedia et al., 2021)
Chicken	Amyloid arthropathy*	(Sevimli et al; 2013)
Mice	<i>T. gondii</i> *	(Atmaca et al., 2019)

Bovine herpes virus 1-BHV 1; Bovine viral diarrhoea virus-BVDV; *Coryza gangrenosa bovis*-CGB; Feline corona virus-FCoV; Foot and mouth disease-FMD; \*-Experimental.

**Table 2.** Summary of triggering events leading to increased Haptoglobin concentration.

Animal	Triggering Event	Reference	
Dog	Parvovirus <i>S. canis</i> <i>Neospora caninum</i>	(Kocaturk et al., 2010) (Arslan and Kırmızıgül, 2020) (Ferreira et al., 2021)	
	Cattle	<i>E. coli</i> F5/Rotavirus/Coronavirus/ <i>Eimeria</i> spp.	(Balıkcı and Al, 2014)
		Brucellosis BRSV/BHV-1/BVDV/BPI 3	(Bozukluhan et al., 2016) (Dörtkardeş and Şahinduran, 2020)
BVDV+BHV-1 CGB FMD <i>B. bigemina</i>		(Sahinduran et al., 2017) (Issi et al., 2017) (Mallick et al., 2021) (Mohammadi et al., 2021)	
Sheep		Sheeppox virus <i>C. parvum</i> *	(Bozukluhan et al., 2018) (Dinler et al., 2017)
		<i>F. hepatica</i>	(Denizhan et al., 2019)
Goat	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> <i>Trichuris</i> spp.+ <i>Trichostrongylidae</i> spp.+ <i>Fasciola</i> spp.	(Akgul et al., 2018) (Ulutaş et al., 2008)	
	Mice	<i>T. gondii</i> *	(Atmaca et al., 2019)

Bovine parainfluenza virus 3-BPI 3; Bovine respiratory syncytial virus-BRSV.

**Table 3.** Summary of triggering events leading to increased C-reactive protein concentration.

Animal	Triggering Event	Reference
	Demodicosis	(Salem et al., 2020)
	Parvovirus	(Kocaturk et al., 2010)
<b>Dog</b>	IBD/Hemangiosarcoma/Lymphoma/Malignant mesothelioma	(Nakamura et al., 2008)
	Pyometra	(Enginler et al., 2014)
	Gastric mucosal injury*	(Bayramli and Ulutas, 2008)
<b>Sheep</b>	Pneumoania	(Haligur and Ozmen, 2011)
<b>Goat</b>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	(Akgul et al., 2018)

Inflammatory bowel disease-IBD.

**Table 4.** Some acute phase reaction studies performed on animals in Turkey.

Animal	Case	Measured APP's	Reference
<b>Cat</b>	Haemobartonellosis/ <i>Isoospora</i> spp./Dermatitis/ Renal failure/Diabetes mellitus	SAA+Hp+Cp+AGP	(Tuna, 2015)
<b>Dog</b>	Parvovirus	SAA+Hp+CRP <sup>x</sup>	(Sahinduran et al., 2016)
	Chronic heart failure	CRP	(Saril et al., 2022)
	Pyometra+Cystic endometrial hyperplasia/Mucometra	SAA+CRP+Fb <sup>x</sup>	(Enginler et al., 2014)
	Gastric mucosal injury*	SAA+Hp+CRP+Fb+ALB	(Bayramli and Ulutas, 2008)
<b>Cattle</b>	Brucellosis	Hp+Cp+ALB	(Bozukluhan et al., 2016)
	BHV-1/BVDV/BRSV/BPI-3/BAV-3	SAA+Hp	(Dörtkardeş and Şahinduran, 2020)
	CGB	SAA+Hp+Cp	(Issi et al., 2017)
	Hydatid cysts+ <i>Trichostrongylus</i> spp.	SAA+Hp <sup>x</sup>	(Sevimli et al., 2015)
<b>Sheep</b>	Sheeppox virus	Hp+Cp+ALB	(Bozukluhan et al., 2018)
	<i>C. parvum</i> *	SAA+Hp	(Dinler et al., 2017)
<b>Goat</b>	Pneumonia	SAA+CRP+SAP <sup>x</sup>	(Haligur and Ozmen, 2011)
<b>Chicken</b>	Amyloid arthropathy*	SAA <sup>x</sup>	(Sevimli et al., 2008; Sevimli et al., 2012)
<b>Mice</b>	<i>T. gondii</i> *	SAA+Hp <sup>x</sup>	(Atmaca et al., 2019)
<b>Rat</b>	Effects of agomelatine on endothelial+cardiac damage*	Hp <sup>x</sup>	(Asci et al., 2019)

α1 acid glycoprotein-AGP; Albumin-ALB; Ceruloplasmin-Cp; C-reactive protein-CRP; Fibrinogen-Fb; Haptoglobin-Hp; Serum amyloid A-SAA; Serum amyloid P-SAP; <sup>x</sup>-Studies with Pathological Evaluation

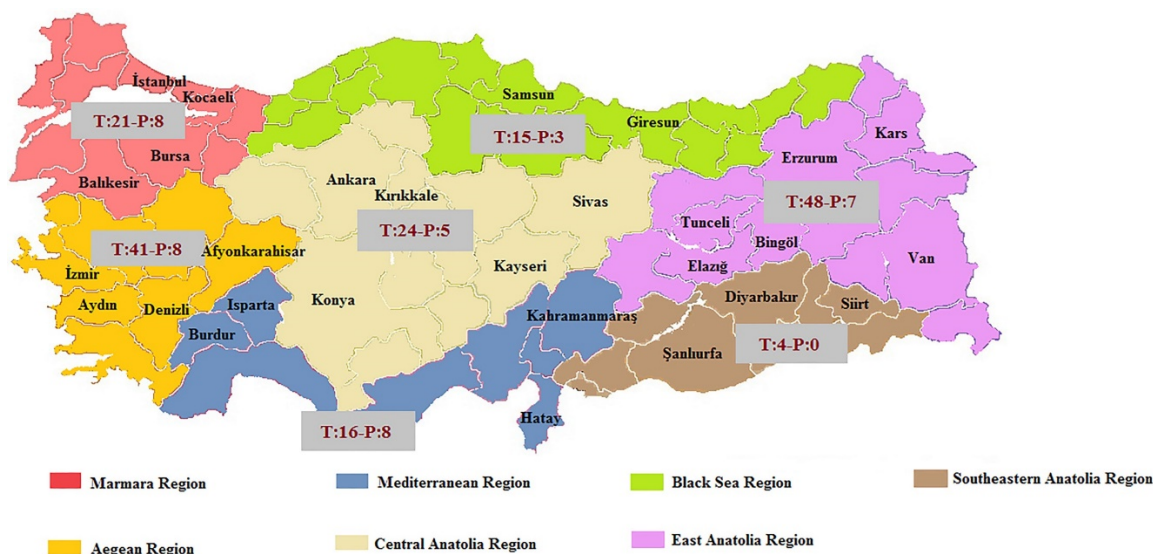


Figure 1. Number of studies on acute phase proteins in animals by regions in Turkey, T: Total number of studies, P: Number of studies with pathological evaluation.

five were case reports, four were thesis dissertations, two were short communications, and 153 were research articles. Approximately 32.5% of the APR studies conducted in Turkey were in large ruminants, 21.3% in laboratory animals, 17.1% in small ruminants, 14.2% in dogs, 8.8% in poultry, 2.3% in fish, and 1.7% in cats and horses. It was noted that only 39 of these studies included pathological evaluation. Some studies performed on APR in various animal species in Turkey are presented in Table 4.

### 2.3. Some Pathology Studies Evaluating Acute Phase Proteins in Turkey

Considering that APPs are sensitive biomarkers in pathophysiological changes, it is critical to evaluate APR both in general terms and pathologically (Bochler & Slauson, 2002). In an experimentally induced *Toxoplasma gondii* infection study in mice, the histopathological evaluation revealed severe tissue damage and perivascular mononuclear cell infiltrations in brain tissue and meninges (Atmaca et al., 2019). In that study, serum APP levels were also measured. It was suggested that significantly increased SAA and Hp levels were indicative of a remarkable role in tissue repair by inducing the activation of leukocytes. In their experimental study on rats Asci et al. (2019), induced endothelial and cardiac damage with lipopolysaccharide (LPS) administration. These researchers observed myofibrillar vacuolar degeneration and neutrophil leukocyte infiltration in the myocardium, and increased Hp expression immunohistochemically. Enginler et al. (2014) detected higher CRP levels in dogs with pyometra than with cystic endometrial hyperplasia. They suggested that serum CRP level can be used as a diagnostic marker to differentiate between these two pathological conditions. In another study (Haligur & Ozmen, 2011), a correlation was found between the expression levels of SAA and TNF- $\alpha$ , and the severity of pneumonia in sheep and goats; these two APPs were proposed as biomarkers to evaluate the severity of pneumonia. Sevimli et al. (2015) found increased SAA and IL-6 levels in cattle with hydatid cysts, necrosis, and inflammation in their lungs and livers. They suggested that SAA was a more sensitive indicator than other APPs in hydatid cyst infections.

### Conclusion

Much information has been gained about the APR and APPs in the last decade, but the relationship between the structure and function of APPs is still not fully elucidated (Ceciliani et al., 2012). The APR is known as the adaptive response of the host to the noxious stimulus (Bochler & Slauson, 2002). It is

generally a fast-forming response and develops before the clinical findings appear and the immune response forms. Therefore, it can be considered an early marker of pathological conditions. The induction of APR and changes in the concentrations of APPs can be detected on the first day of the noxious stimulus. Thus, APPs have a very high sensitivity to detecting subclinical infections (Ceron et al., 2005). Circulating concentrations of APPs are correlated with the degree of tissue damage in the affected animal. Therefore, the measurement of APP concentrations is a powerful marker for assessing the presence and extent of the disease process and the effectiveness of disease management in veterinary medicine (Eckersall, 2000). However, the correct timing for sampling is a prerequisite for diagnostic and prognostic values (Murata et al., 2004). More emphasis has been given to the follow-up of APR in animals for clinical and experimental purposes in the last ten years (Eckersall, 2000). However, this rate is meager in Turkey compared to the studies conducted in the world. It has been noted that APR studies conducted worldwide are primarily on ruminants and pet animals, whereas the studies conducted in Turkey mainly focused on ruminants. According to the 2021 data of the Turkish Statistical Institute (2021), the number of studies and the pathological evaluations in these studies are insufficient in regions where animal husbandry is intense, such as the Southeastern Anatolia Region and the Black Sea Region. The use of APPs for the diagnosis and prognosis is also insufficient in pet animals. In the clinical environment, blood samples can be tested for APPs and also APR can be evaluated in addition to histopathology for the diagnosis postmortem.

This review is the first to evaluate studies on APR in terms of both general and pathological aspects in veterinary medicine in Turkey. We hope that this review may contribute to the research on APPs, which are sensitive biomarkers in diagnosing diseases.

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

### Ethical Approval

This study is not subject to HADYEK's permission in accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees". ("Ethical Declaration Form" has been filled and uploaded to the system.)

## Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 7% as stated in the report uploaded to the system.

## Acknowledgements

This review is summarized from Belma DAYI's Ph.D. seminar. We thank Assoc. Prof. Dr. İ. Taci CANGÜL for his scientific help.

## Author Contributions

Motivation / Concept: BD, AS  
Control/Supervision: BD, AS  
Data Collection and / or Processing: BD, AS  
Analysis and / or Interpretation: BD, AS  
Literature Review: BD, AS  
Writing the Article: BD, AS  
Critical Review: BD, AS

## References

- Akgul G, Akgul MB, Ozen D, Demirbilek SK, 2018: Comparison of serum procalcitonin, haptoglobin and C-reactive protein levels in goats with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Indian J Anim Res*, 52, 1778-1781.
- Anonim (1), <https://biruni.tuik.gov.tr/ilgosterge/?locale=tr>, Date of access; 20.03.2022
- Arslan A, Kırmızıgül AH, 2020: Serum amyloid-A, haptoglobin and ceruloplasmin levels in dogs infected with *Sarcoptes canis*. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg*, 15, 1-6.
- Asci H, Özmen O, Erzurumlu Y, Sofu A, İcten P, Kaynak M, 2019: Agomelatine protects heart and aorta against lipopolysaccharide-induced cardiovascular toxicity via inhibition of NF- $\kappa$ B phosphorylation. *Drug Chem Toxicol*, 13, 1-10.
- Atmaca HT, Gazyagci AN, Terzi OS, Dincel GC, Sumer T, 2019: Tracking acute phase protein response during acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Lab Anim Res*, 35, 1-9.
- Balikci E, Al M, 2014: Some serum acute phase proteins and immunoglobulins concentrations in calves with rotavirus, coronavirus, *E. coli* F5 and *Eimeria* species. *Iran J Vet Res*, 15, 397-401.
- Bayramli G, Ulutas B, 2008: Acute phase protein response in dogs with experimentally induced gastric mucosal injury. *Vet Clin Pathol*, 37, 312-316.
- Bochsler PN, Slauson DO, 2002: Inflammation and repair of tissue. In: Mechanisms of Disease. A Textbook of Comparative General Pathology, Slauson DO, Cooper BJ (Eds), 223-225, Mosby, St Louis, USA.
- Bozukluhan K, Merhan O, Büyük F, Çelebi Ö, Gökçe G, 2016: Determination of some acute phase proteins level in cattle with brucellosis. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 63, 13-16.
- Bozukluhan K, Merhan O, Gökçe Hİ, Ögün M, Atakişi E, Kızıltepe Ş, Gökçe G, 2018: Determination of some acute phase proteins, biochemical parameters and oxidative stress in sheep with naturally infected sheepox virus. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 24, 437-441.
- Cecilianı F, Ceron JJ, Eckersall PD, Sauerwein H, 2012: Acute phase proteins in ruminants. *J Proteomics*, 75, 4207-4231.
- Cecilianı F, Giordano A, Spagnolo V, 2002: The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein Pept Lett*, 9, 211-223.
- Ceron JJ, Eckersall D, Martinez-Subiela S, 2005: Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*, 34, 85-99.
- Denizhan V, Kozat S, Yılmaz AB, 2019: Investigation of serum amyloid A, haptoglobin and fibrinogen levels in sheep infected with *Fasciola hepatica*. *J Livest Sci*, 10, 53-58.
- Dinler C, Ulutas B, Voyvoda H, Ulutas PA, Ural K, Karagenc T, 2017: Haptoglobin and serum amyloid-A concentrations and their relationship with oocyst count in neonatal lambs experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. *Vet Parasitol*, 247, 49-56.
- Dörtkardeş AB, Şahinduran Ş, 2020: Determination of serum amyloid A, haptoglobin and hepcidin levels in calves with endemic viral pneumonia. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 67, 127-131.
- Eckersall PD, 2000: Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Rev Med Vet*, 151, 577-584.
- Enginler SO, Ateş A, Sığircı BD, Sontaş BH, Sönmez K, Karaçam E, Ekici H, Dal GE, Gürel A, 2014: Measurement of C-reactive protein and prostaglandin F<sub>2α</sub> metabolite concentrations in differentiation of canine pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra. *Reprod Domest Anim*, 49, 641-647.
- Ferreira RF, Dittrich RL, Zimmermann IB, Ljubic BB, Mrljak V, Eckersall PD, 2021: Differential acute-phase protein responses in dogs seropositive or seronegative for *Neospora caninum*. *Parasitol Res*, 120, 3529-3535.
- Halıgür M, Özmen O, 2011: Immunohistochemical detection of serum amyloid-A, serum amyloid-P, C-reactive protein, tumour necrosis factor- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  receptor in sheep and goat pneumonias. *Rev Med Vet*, 162, 475-481.
- Hedia M, Ibrahim S, Mahmoud K, Ahmed Y, Ismail S, Beley ME, 2021: Hemodynamic changes in cytokines, chemokines, acute phase proteins and prostaglandins in mares with subclinical endometritis. *Theriogenol*, 171, 38-4.
- Issi M, Gül Y, Başbuğ O, Ulutaş PA, 2017: Haptoglobin, serum amyloid A and ceruloplasmin concentrations in cattle with suspicion of coryza gangrenosa bovum. *Vet Arh*, 87, 703-712.
- Kocaturk M, Martinez S, Eralp O, Tvarijonavičiute A, Ceron J, Yılmaz Z, 2010: Prognostic value of serum acute-phase proteins in dogs with parvoviral enteritis. *J Small Anim Pract*, 51, 478-483.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC, 2014: Robbins Basic Pathology. 9 th ed., Elsevier, Philadelphia, USA.



- Mallick S, Subramaniam S, Biswal JK, Ranjan R, Mohapatra JK, Sahoo AP, 2021: Short communication: preliminary observations on the serum levels of HSP70 and its correlation with serum cortisol, thyroid hormones, and acute-phase protein concentration in cattle naturally infected with foot-and-mouth disease virus. *Trop Anim Health Prod*, 53: 1-5.
- Mohammadi S, Mohammadi V, Esmailnejad B, 2021: Evaluation of some acute phase proteins in cattle naturally infected with *Babesia bigemina*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 76, 1-4.
- Murata H, Shimada N, Yoshioka M, 2004: Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*, 168, 28-40.
- Nakamura M, Takahashi M, Ohno K, Koshino A, Nakashima K, Setoguchi A, Fujino Y, Tsujimoto H, 2008: C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *Clin Pathol*, 70, 127-131.
- Sahinduran S, Albay MK, Karakurum MC, Ozmen O, Kale M, 2016: Investigation of some cytokines, acute phase proteinase and hepcidin levels before and after treatment in dogs with parvoviral gastroenteritis. *Pak Vet J*, 36, 487-492.
- Sahinduran S, Kale M, Kıyıcı R, Sevgisunar NS, 2017: Some acute phase proteins and hepcidin levels in single and dual infection with BVD and BHV-1. *MAKÜ Sag Bil Enst Derg*, 5, 115-123.
- Salem NY, Saeed HA, Farag HS, Ghandour RA, 2020: Canine demodicosis: hematological and biochemical alterations. *Vet World*, 13, 68-72.
- Saril A, Kocaturk M, Shimada K, Uemura A, Akgün E, Levent P, Baykal AT, Prieto AM, Agudelo CF, Tanaka R, Ceron JJ, Koch J, Yilmaz Z, 2022: Serum proteomic changes in dogs with different stages of chronic heart failure. *Anim*, 12, 2-14.
- Sevimli A, Bülbül T, Bülbül A, Yağcı A, 2013: Chicken amyloid arthropathy: serum amyloid A, interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, tumour necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide profile in acute phase (12<sup>th</sup> hour). *Pol J Vet Sci*, 16, 241-247.
- Sevimli A, Mısırlıoğlu D, Yağcı A, Bülbül A, Yılmaztepe A, Altunbas K, 2008: The role of chicken IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the occurrence of amyloid arthropathy. *Vet Res Commun*, 32, 499-508.
- Sevimli A, Sevimli FK, Şeker E, Ulucan A, Demirel HH, 2015: Acute-phase responses in cattle infected with hydatid cysts and microbial agents. *J Helminthol*, 89, 471-479.
- Sevimli A, Yalcin M, Cangul IT, Aydin S, 2012: Investigation of serum amino acid and serum amyloid A concentrations in chickens with amyloid arthropathy. *Vet Q*, 52, 17-23.
- Tuna GE, 2015: Sağlıklı ve farklı hastalıklı kedilerde serum akut faz protein konsantrasyonlarının araştırılması. PhD, ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Ulutaş PA, Voyvoda H, Ulutaş B, Aypak S, 2008: Haptoglobin, serum amyloid-A and ceruloplasmin concentrations in goats with mixed helminth infection. *Turkiye Parazitoloj Derg*, 32, 229-233.

\*Correspondence: Belma DAYI

Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, 03200, Afyonkarahisar, Turkey.

e-mail: belmadayi@aku.edu.tr

## HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ YAYIN KURALLARI \*

**1-** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi (Harran Üniv Vet Fak Derg), özellikle Veteriner Hekimliği bilim alanı ile ilgili olmak üzere insan ve hayvan sağlığını kapsayan Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanmış orijinal klinik ve deneysel araştırmalar, olgu sunumları, derlemeler (çağrılı veya sorumlu yazara ait derleme konusu ile ilgili en az 3 araştırma makalesinin referans listesinde olması gereklidir), kısa bilimsel makale ve editöre mektuplar yayınlayan hakemli bir dergidir. Dergide İngilizce hazırlanmış makalelerin yayımlanmasına öncelik verilir. Dergi 6 ayda bir, yılda 2 sayı olarak yayınlanır. Yayınlanan makalelerden ücret alınmamaktadır.

**2-** Dergiye kabul edilen yayınlar başka bir yerde yayınlanmamış olmalıdır. Eş zamanlı olarak incelenmek üzere başka dergilere gönderilmiş olmamalıdır. Yayınlanan makalelerden doğacak her türlü hukuki ve cezai sorumluluk yazarlara aittir. Yazarlara yayın hakkı bedeli ödenmez. Gönderilen makaleler ve ekleri makale yayınlansın veya yayınlanmasın geri iade edilmez.

**3-** Daha önce kongrelerde tebliğ edilmiş ve özeti yayımlanmış çalışmalar, bu durum kapak sayfasında belirtilmek üzere kabul edilir. Bununla birlikte yayın, tezden üretilmiş ise ve destekleyen kuruluş var ise yayında belirtilmelidir.

**4-** Dergi Editörlüğüne ulaşan makale, dergi editörlüğüne ön değerlendirmeye tabi tutulur. Editörlük, ön değerlendirme sonucuna göre makaleyi reddetme veya hakem değerlendirmesine tabi tutmadan önce düzeltme isteme hakkına sahiptir.

**5-** Makaleler değerlendirme için en az iki hakeme gönderilir. Makale kabul sürecinde, iki hakemin görüşlerinin farklı olması durumunda editör, üçüncü bir hakemin veya danışma kurulunun görüşünü alarak karar verir.

**6-** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, etik ilkelere saygı çerçevesinde, TÜBİTAK ULAKBİM tarafından Türkiye'de tüm üniversitelerin kullanımına açmış olduğu "ithenticate" intihal tespit programı aracılığıyla gönderilen tüm makale, olgu sunumu ve derlemelerin ön değerlendirmesinin yapılması ve sonuçların gönderilmesi gerekmektedir. Bu ön değerlendirme sonuçlarına göre, makale, olgu sunumu veya derlemelerin başka kaynaklarla benzerlik oranının **%15'i** (özet, abstract ve kaynaklar hariç) aşmaması gerekmektedir. "ithenticate" programı aracılığı ile yapılacak öndeğerlendirmede benzerlik oranının %15 değerini aşması durumunda yayımlanmak üzere dergimize gönderilen makale, olgu sunumu veya derlemeler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

**7-** Gönderilen herhangi bir makalenin (tüm makale kategorileri için) referanslarının en az % 20'sinin son beş yılda yayınlanan referansları içermesi gerekir. Anonim kaynaklar asgari düzeyde tutulmalıdır.

**8-** Makale yayına kabul edildiği takdirde her türlü yayın hakkının devredildiğine dair beyanları kapsayan Telif Hakkı Devir Sözleşmesinin tüm yazarlar tarafından imzalanarak basımdan önce elektronik olarak dergi editörlüğüne gönderilmesi gerekmektedir. Telif Hakkı Devir Sözleşmesi gönderilmeyen makaleler yayımlamaya kabul edilmiş olsalar bile basılmazlar.

**9-** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderilecek makale, olgu sunumu, derleme vb. çalışmalar, <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd> adresinden gönderildiğinde değerlendirme sürecine alınmaktadır.

**10-** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderilecek makale, olgu sunumu, derleme vb. çalışmalar MS Word formatında, tüm fotoğraflar (resimler) en az 300 dpi çözünürlükte, TIFF veya JPEG formatında kaydedilmiş olmalıdır.

## YAZIM KURALLARI

Yazılar, MS Word formatında, Times New Roman yazı tipinde, 12 punto, çift satır aralıklı ve her kenardan 2.5 cm boşluk bırakılarak hazırlanmalıdır. Makaleye satır numaraları (makalenin 2. sayfasından başlamak üzere sürekli olacak şekilde) eklenmelidir. Bu şekildeki yazılar, şekil ve tablolar dâhil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalar ve derlemelerde 15, kısa bilimsel makale ve olgu sunumlarında 5 sayfayı geçmemelidir.

Birimler ve ölçüler için Uluslararası Standart birimleri (SI-sistem) kullanılmalıdır.

**Araştırma Makaleleri:** Orijinal araştırma makaleleri aşağıdaki ana konu sıralamasına göre dizilmelidir: Başlık, Yazar adları (Sorumlu yazar (\*) ile işaretlenmeli), Yazar adresleri, Yazar ORCID numaraları, Özet ve Anahtar kelimeler (3 - 6 kelime), İngilizce başlık, Abstract ve Keywords ile Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Teşekkür veya Bilgilendirme ile Kaynaklar. Her bir Tablo ve Şekil ayrı sayfalarda yer almalıdır.

## YAZIM DÜZENİ

**Özet:** Orijinal araştırma makalelerinde 250, diğer makale türlerinde 200 kelimeyi geçmeyecek şekilde hazırlanmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** En fazla 6 tane olmak üzere her iki dildeki özeti altında alfabetik sırayla verilmelidir. Anahtar kelimeler, Türkiye Bilim Terimleri arasından seçilmelidir. Anahtar kelimelerin seçiminde Türkiye Bilim Terimleri internet adresinden (<http://www.bilimterimleri.com>) yararlanılmalıdır.

**Giriş:** Sonuçların anlaşılabilirliği ve yorumlanabilirliği için o konu ile ilgili yapılmış olan çalışmalar hakkında bilgilere yer verilmelidir. Giriş'te çalışmanın hipotezi belirtilmelidir. Çalışmanın amacı bu bölümün en sonunda açık olarak yazılmalıdır.

**Materyal ve Metot:** Bu bölümde deneysel çalışmalar diğer araştırmacılar tarafından tekrarlanabilecek yeterlilikteki detayı ile verilmelidir. Uluslararası indeksli dergilerde yayınlanmış bir makalede açıklanan bir teknik kullanıldığında, metodun çok kısa açıklanması ve ilgili orijinal makaleye atıf yapılması gereklidir. Makalede etik kurul izni ve/veya yasal/özel izin alınmasının gerekip gerekmediği bu bölümde belirtilmelidir. Materyal olarak hayvan kullanılan orijinal araştırma makalelerinde (klinik, deneysel, saha çalışmaları vb.); etik kurul onayı alınmış olmalıdır. Etik kurul onay/izin belgesinin "alındığı etik kurulun ismini, sayısını ve tarihini" içeren açıklayıcı bilgiler materyal ve metot bölümüne yazılmalıdır. Yayın kurulu etik kurul onay belgesini isteme hakkına sahiptir.

**Bulgular:** Araştırma bulguları açık ve anlaşılabilir şekilde verilmelidir. Bulgular, gerektiğinde tablo ve şekillerle desteklenmeli ve kısa olarak sunulmalıdır.

**Tartışma ve Sonuç:** Bulgular gereksiz ayrıntıya girmeden literatürler ışığında tartışılmalı ve bulguların önemi vurgulanmalıdır. Sonuç ya da öneri cümlesi ile bitirilmelidir.

**Teşekkür:** Çalışma veya makaleye kişisel katkı ve parasal destek burada belirtilmelidir.

**Derleme:** Derginin yayın alanlarındaki konularda yenilikleri içeren, güncel kaynaklardan yararlanılarak hazırlanmış makaleler olup, yazarların konu ile doğrudan ilişkili en az 3 adet çalışmalarının olması ve bunların derleme içinde kullanılması durumunda yayınlanmak üzere kabul edilebilecektir. Sorumlu yazar, derlemesini gönderirken konu ile ilgili makalelerinin de künye bilgilerini dergi editörlüğüne göndermelidir (makale künyeleri, makale metninin en son sayfasında sunulmalıdır). Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nde değerlendirmeye alınan ve yayınlanan derlemeler **çağrılı derlemelerden** oluşmaktadır. Derlemelerde; Özet, Giriş, Sonuç ve Kaynaklar bölümleri bulunmalıdır.

**Olgu Sunumu:** Yazarların, karşılaştıkları yeni veya ender gözlemlenen olguların ele alındığı, bilimsel değere sahip bilgileri içeren eserlerdir. En fazla 15 kaynak kullanılmalı ve bu kaynakların güncel olmasına özen gösterilmelidir. Olgu sunumları; Özet, Giriş, Olgu tanımı, Tartışma ve Sonuç ile Kaynaklar bölümlerinden oluşmalıdır.

**Kısa Bilimsel Makale:** Kısa bilimsel makalelerde dar kapsamlı olarak ele alınmış, yeni bilgi ve bulgular sunulmalıdır. Araştırma makalesi formatında hazırlanmalı ve en fazla 5 sayfa olmalıdır. En fazla 2 tablo veya şekil içermelidir.

### **Kaynaklar**

Metin içinde atıf yapılırken;

1. Yazar veya yazarların soyadından sonra parantez içinde kaynağın yayın yılı belirtilmelidir; Adams (1998) tarafından; Wilkie ve Whittaker (1997) tarafından; Doyle ve ark. (2007) tarafından....
2. Cümlelerin sonunda atıf yapıldığında ise yazar ismi ve yayın yılı parantez içinde belirtilmelidir; ... bildirilmiştir (Adams, 1998); .... bildirilmiştir (Wilkie ve Whittaker, 1997); ..... bildirilmiştir (Doyle ve ark., 2007).
3. Birden çok kaynağa atıf yapılması durumunda önce alfabetik sonra kronolojik sıralama yapılmalıdır; .... bildirilmiştir (Adams, 1998; Adams, 2008; Doyle ve ark., 2007; Wilkie ve Whittaker, 2006).
4. Aynı yazarın aynı yıl yayınları söz konusu ise her biri "a" harfinden başlayarak küçük harflerle işaretlenmelidir; .... (Adams, 2005a; Adams, 2005b;...).

**Kaynak listesi aşağıdaki şekilde hazırlanmalıdır:**

1. **Kaynak listesi yazar soyadına göre alfabetik olarak sıralanmalıdır.**
2. **Kaynaklarda yer alacak dergi adları ISI web of Science'a göre kısaltılmalı ve italik yazılmalıdır.**
3. **Kaynakların yazın şekli aşağıdaki şekilde olmalıdır.**

**Makale;** Sullivan JC, Sasser JM, Pollock JS, 2007: Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 292 (1), 64-68.

**Kitap;** Cadenas E, Packer L, 2001: Handbook of Antioxidants. 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, USA.

**Kitaptan bir bölüm:** Bahk J, Marth EH (1990). Listeriosis and *Listeria monocytogenes* In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), 248-256, Academic Press, San Diego. **Web sayfası:** Anonim (1) <http://www.emea.europa.eu>, Erişim tarihi; 01.04.2010.

**Tez:** Er A, 2009: Makrolid grubu antibiyotiklerin endotoksemide sitokin düzeylerine etkisi. Doktora tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

**Bilimsel toplantıda sunulan bildiri:** Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN, 2006: Re-establishment of oviducal patency and fertility in infertile mares. In: Proceedings of the Ninth International Symposium on Equine Reproduction, Kerkrade, Holland, pp. 27-28.

**Tablo ve Şekiller:** Her bir tablo ve şekil ayrı sayfalara yerleştirilmelidir. Kullanım sırasına göre numaralandırılmalı, kısa başlıklarla ifade edilmeli ve metin içinde tablo numarası verilerek atıfta bulunulmalıdır. Tablo başlıkları makalenin yazım dilinde tablonun üst bölümüne yazılmalıdır. Tabloda kullanılan kısaltmalar ve gerekli açıklamalar tablo altında verilmelidir. Şekil başlıkları makalenin yazım dilinde şeklin alt bölümüne yazılmalıdır.

## HARRAN UNIVERSITY VETERINARY FACULTY JOURNAL PUBLICATION RULES \*

- 1- Journal of Harran University Veterinary Faculty is a refereed journal that publishes original clinical and experimental research in Turkish and English, covering human and animal health, especially in the field of Veterinary Science, case reports, reviews (at least 3 on the subject of compilation of the invited or responsible author) the research paper must be on the reference list), short scientific articles and letters to the editor. Publishing articles in English is given priority in the journal. The journal is published electronically every 6 months and 2 issues a year. There are no fees for published articles.
- 2- Publications accepted to the journal should not have been published elsewhere. It should not have been submitted to other journals for review simultaneously. All legal and criminal liability arising from the published articles belong to the authors. Authors are not paid the right to publish. Submitted articles and their attachments are not returned, whether the article is published or not.
- 3- The works that have been previously communicated in congresses and published with a summary are accepted to be stated on the cover page. However, if the publication is produced from the thesis and there is a supporting organization, it should be stated in the publication.
- 4- The article that reaches the Journal Editor is subjected to preliminary evaluation by the journal editor. Editing has the right to reject the article according to the preliminary evaluation result or to request correction before subjection to the reviewer.
- 5- Articles are sent to at least two referees for evaluation. In the article acceptance process, if the opinions of the two referees differ, the editor decides by taking the opinion of a third referee or advisory board.
- 6- TUBITAK ULAKBIM respect for ethical principles, which opened to the use of all universities in Turkey "iThenticate" sent through plagiarism detection program, the whole article, must be made of the case report and review of the preliminary assessment and the delivery of results. According to these preliminary evaluation results, the similarity rate of articles, case reports or reviews with other references should not exceed 15% (excluding abstract, abstract and references). Articles, case reports or reviews sent to our journal for publication will not be evaluated if the similarity rate exceeds 15% in the evaluation made through the "ithenticate" program.
- 7- At least 20% of references to any submitted article (for all article categories) must include references published in the last five years. Anonymous references should be kept to a minimum.
- 8- If the article is accepted for publication, the Copyright Transfer Agreement, which includes the declaration that any right of publication has been transferred, must be signed by all authors and sent to the journal editor before printing. Articles without Copyright Transfer Agreement are not published even if they are accepted to publish.
- 9- An article, case report, review etc. to be sent to Harran University Veterinary Faculty Journal. When the works are sent to <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>, they are taken into the evaluation process.
- 10- An article, case report, review etc. to be sent to Harran University Veterinary Faculty Journal. Works must be saved in MS Word format, all photographs (pictures) at least 300 dpi resolution, in TIFF or JPEG format.

## WRITING RULES

Manuscripts should be prepared in MS Word format, Times New Roman font, with 12 font size, double line spacing and 2.5 cm space on each side. Line numbers (continually starting from page 2 of the article) should be added to the article. Articles of this type should not exceed 15 pages in original scientific research and reviews, including figures and tables, and 5 pages in short scientific articles and case reports.

International Standard Units (SI-system) should be used for units and dimensions.

Research Articles: Original research articles should be arranged in the order of the following main topics: Title, Author names (must be marked with the responsible author (\*)), Author addresses, Author ORCID numbers, Abstract and Keywords (3 - 6 words), English title, Abstract and Introduction to Keywords, Material and Method, Results, Discussion and Conclusion, Thanks or Information and References. Each Table and Figure should be on separate pages.

## STYLE AND FORMAT

Abstract: It should be prepared not to exceed 250 words in original research articles and 200 words in other types of articles.

Keywords: It should be given in alphabetical order below the summary in both languages, maximum 6. Keywords should be selected from Turkey Science Terms. Turkey Science Terms in the selection of keywords from the internet address (<http://www.bilimterimleri.com>) should be utilized.

Introduction: In order for the results to be understood and interpreted, information about the studies done on that subject should be included. In the introduction, the hypothesis of the study should be specified. The purpose of the study should be clearly written at the end of this section.

Material and Method: Experimental studies should be given in this section with sufficient detail that can be repeated by other researchers. When using a technique described in an article published in international indexed journals, it is necessary to describe the method very briefly and to cite the relevant original article. In the article, it should be stated in this section whether the ethical committee permission and / or legal / special permission should be obtained. In original research articles using animals as materials (clinical, experimental, field studies, etc.); ethics committee approval must have been obtained. Explanatory information including the name, number and date of the ethics committee's ethics committee approval / permit document should be written in the material and method section. The editorial board has the right to request the ethics committee approval document.

Results: Research findings should be given clearly and understandably. Findings should be supported with tables and figures when necessary and presented briefly.

Discussion and Conclusion: Findings should be discussed in the light of the literature before going into unnecessary detail and the importance of the findings should be emphasized. It should be finished with a conclusion or suggestion sentence.

Acknowledgment: Personal contribution and monetary support to the study or article should be stated here.

Compilation: These are articles that contain innovations on the subjects of the journal's publications and are prepared by using current references. If the authors have at least 3 works directly related to the subject and they can be accepted for publication. When submitting his review, the responsible author should send the imprint information of the articles related to the subject to the editor of the journal (article tags must be presented on the last page of the article text). Reviews compiled and published in Harran University Veterinary Faculty Journal are invited reviews. In the compilation; Summary, Introduction, Conclusion and References sections should be available.

Case Report: These are the works that contain information of scientific value that the authors discuss the new or rare cases that they encounter. Maximum 15 references should be used and care should be taken to keep these references up to date. Case reports; It should consist of Summary, Introduction, Case description, Discussion and Conclusion and References sections.

Short Scientific Article: In short scientific articles, it should be handled narrowly and new information and findings should be presented. It should be prepared in the form of a research paper and should not exceed 5 pages. Must contain no more than 2 tables or figures.

References:

While citing in the text;

1. The publication year of the reference should be specified in parentheses after the surname of the author or authors; By Adams (1998); By Wilkie and Whittaker (1997); Doyle et al. (2007) by....

2. When cited at the end of the sentence, the name of the author and the year of publication must be indicated in parentheses; ... have been reported (Adams, 1998); .... has been reported (Wilkie and Whittaker, 1997); ..... has been reported (Doyle et al., 2007).

3. In case of reference to more than one reference, first alphabetical and chronological order should be done;

.... reported (Adams, 1998; Adams, 2008; Doyle et al., 2007; Wilkie & Whittaker, 2006).

4. If the same author has publications in the same year, each should be marked in lowercase letters, starting with the letter "a";

.... (Adams, 2005a; Adams, 2005b;...).

The list of references should be prepared as follows:

1. Reference list should be listed alphabetically by author surname.

2. The names of the journals in the references should be shortened according to the ISI web of Science and should be written in italics.

3. Type of references should be as follows.

Journal article; Sullivan JC, Sasser JM, Pollock JS, 2007: Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 292 (1), 64-68.

Book; Cadenas E, Packer L, 2001: Handbook of Antioxidants. 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, USA.



Chapter in a book: Bahk J, Marth EH (1990). Listeriosis and *Listeria monocytogenes* In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), 248-256, Academic Press, San Diego. Web page: Anonymous (1) <http://www.emea.europa.eu>, Access date; 01.04.2010.

Thesis: Er A, 2009: Effect of macrolide antibiotics on cytokine levels in endotoxemia. PhD thesis, SU Health Sciences Institute, Konya.

Paper presented at the scientific meeting: Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN, 2006: Re-establishment of oviducal patency and fertility in infertile mares. In: Proceedings of the Ninth International Symposium on Equine Reproduction, Kerkrade, Holland, pp. 27-28.

Tables and Figures: Each table and figure should be placed on separate pages. It should be numbered according to the order of use, expressed in short titles, and should be cited by giving the table number in the text. Table titles should be written in the writing language of the article in the upper part of the table. Abbreviations and necessary explanations used in the table should be given under the table. Figure titles should be written at the bottom of the figure in the writing language of the article.

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

## TELİF HAKKI DEVİR FORMU

Harran Üniversitesi

Veteriner Fakültesi Dergisi Editörlüğüne

Biz aşağıda adı, soyadı ve imzaları bulunan yazarlar, tarafımızdan yazılmış,

.....  
.....

İsimli makalenin içeriği, sonuçları ve yorumları konusunda, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nin hiçbir sorumluluk taşımadığını kabul ederiz. Sunduğumuz makalenin orijinal olduğunu, herhangi bir başka dergiye yayınlanmak üzere gönderilmediğini, daha önce yayınlanmadığını beyan ederiz. Makalenin telif hakkından feragat etmeyi kabul ederek sorumluluğu üstlenir ve imza ederiz. Makalenin telif hakkı Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne devredilerek yayınlanması konusunda yetkili kılınmıştır.

Bununla birlikte yazarların aşağıdaki hakları saklıdır:

1. Telif Hakkı dışında kalan patent v.b. bütün tescil edilmiş haklar.
2. Yazarın gelecekteki kitaplar ve dersler gibi çalışmalarında; makalenin tümü ya da bir bölümünü ücret ödemeksizin kullanma hakkı.
3. Makaleyi ticari amaçlarla kullanmamak koşulu ile çoğaltma hakkı.

Yazarın Adı ve Soyadı

Tarih

İmza

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**Sorumlu yazarın adı/yazışma adresi:**

.....

Telefon: ..... Fax: ..... E-mail: .....

*(Makale başvurusu ile bu formu bütün yazarlar tarafından imzalanmış olarak "<http://dergipark.gov.tr/huvfd>" adresinden yükleviniz.)*

**COPYRIGHT TRANSFER FORM**

We grant that Harran University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine has no responsibility for the content, results and conclusions of the manuscript entitled,

.....  
.....

We state that the submitted manuscript is original, has not been published or is not being considered for publishing elsewhere. We grant to disclaim the copyright and sign this form by undertaking all responsibility. Hereby Harran University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine has been authorized for publishing by transferring the copyright of the manuscript.

However the following rights of the author(s) are reserved:

1. All other rights such as patent right.
2. The rights for using the manuscript as a whole or a part in their future Works such as books or lectures without paying any charge.
3. The rights for reproducing the manuscript for purpose other than commercial use.

<u>Name and Surname of the Author</u>	<u>Date</u>	<u>Signature</u>
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....

**Address of the Corresponding Author:**

.....  
.....

Phone: ..... Fax: ..... E-mail: .....

*(Upload the form to "<http://dergipark.gov.tr/huvfd>" after filling it.)*

