

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

*Harran University  
Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*



6 Şubat 2023 tarihli depremlerde kaybettiğimiz yurttaşlarımızın anısına saygıyla ...

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

# 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:2023

CİLT/VOLUME:12

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  
Doç. Dr. Raşan YILMAZ  
Doç. Dr. Deniz KORKMAZ  
Doç. Dr. Serap KILIÇ ALTUN  
Doç. Dr. Birten EMRE  
Dr. Öğr. Üyesi Mücahit KAHRAMAN

**İngilizce Editörü/English Editor**  
Prof. Dr. Ayşe MENTEŞ

**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: 2023- Cilt/Volume: 12 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. Raşan ÖZEN, Fırat Üniv. Vet. Fak. Elazığ, Türkiye.  
Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Doç. Dr. İlkur 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 Azerbaijan.  
Dr.Tomasz Szara, Institute of Veterinary Medicine. Warsaw, Poland.

**Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**  
**2023 Yılı 12. Cilt 1. Sayı Hakem Listesi (alfabetik sıra)**  
**The Referees List of This Issue (in alphabetical order)**

Prof. Dr. Aşkın YAŞAR	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Aylin KASIMOĞLU	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ayşe MENTEŞ	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Emine BAYDAN	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Engin BALIKÇI	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Evrim DERELİ FİDAN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Gültekin ATALAN	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Hakan KALENDER	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Mehmet Cengiz HAN	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Mehmet KALE	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Mitat ŞAHİN	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Nadide Nabil KAMILOĞLU	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ömer KORKMAZ	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Rahşan ÖZEN	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Salih OTLU	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Şerife TÜTÜNCÜ	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Tayfun ÇARLI	Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Veysel Soydal ATASEVEN	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Yakup YILDIRIM	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Ahmet Yusuf ŞENGÜL	Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Akın YİĞİN	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Ayşe Zeynep AKKUTAY YOLDAR	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Dilek AKŞİT	Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Funda YİĞİT	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Hakan İŞİDAN	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Hasan AKŞİT	Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. İftar GÜRBÜZ	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Kübra KARAKAŞ ALKAN	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Oktay KAPLAN	Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Osman YILMAZ	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Rahime YAYGINGÜL	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Semra GÜRBÜZ	Mardin Artuklu Üniversitesi Turizm Fakültesi
Doç. Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Seyithan SEYDOŞOĞLU	Siirt Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Doç. Dr. Uğur PARIN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Zeki ARAS	Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Çağrı KALE	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Duygu BUDAK	Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Gülşahen GÜNGÖREN	Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Günsel KIRMAN	Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ÖZKAN	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ÇETİN	Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Hanifi YALÇIN	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Polat İPEK	Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Sibel KIZIL	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Meltem SAĞIROĞLU	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi

**İçindekiler / Contents**

<b>Araştırma Makaleleri / Research Articles</b>		<b>Sayfa /Page</b>
1.	Three-dimensional reconstruction and morphometric analysis of mandible of Hamdani sheep: A computed tomography (CT) study Hamdani koyununun mandibulasının üç boyutlu rekonstrüksiyonu ve morfometrik analizi: Bilgisayarlı tomografi (BT) çalışması <b>Barış Can GÜZEL, İsmail DEMİRCİOĞLU, Nazan GEZER İNCE</b>	001-008
2.	Türkiye’de Karadeniz Bölgesindeki Koyunlarda Mavidil Enfeksiyonunun Seroprevalansı Seroprevalence of Bluetongue Infection in Sheep in the Black Sea Region of Turkey <b>Hanne Nur KURUÇAY, Bahadır MÜFTÜOĞLU, Cüneyt TAMER</b>	009-013
3.	Postnatal Gelişme Dönemlerinde Capsaicin Uygulanan Fare Testislerinde TGF Beta-1’in İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu The Immunohistochemical Localization of TGF Beta-1 in Capsaicin Injected Mice Testis at the Postnatal Development Period <b>Cansel Güzin ÖZGÜDEN AKKOÇ</b>	014-020
4.	Molecular Diagnosis of Bovine Genital Mycoplasmosis and Ureaplasma Infections by PCR Sığırların Genital Mikoplazma ve Üreplazma İnfeksiyonlarının PCR ile Moleküler Teşhisi <b>Başak OKSAY, Kadir Serdar DIKER</b>	021-026
5.	Investigation of the Effects of Jerusalem Thorn ( <i>Paliurus spina-christi</i> Mill.), Oriental Hackberry ( <i>Celtis tournefortii</i> L.) Fruits and Black Cumin ( <i>Nigella sativa</i> L.) Seed on Microbial Quality and Physicochemical Properties of Meatballs Karaçalı ( <i>Paliurus spina-christi</i> Mill.), Dardağan ( <i>Celtis tournefortii</i> L.) Meyvelerinin ve Çörek Otu ( <i>Nigella sativa</i> L.) Tohumunun Köftelerin Mikrobiyal Kalitesi ve Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması <b>Mehmet Emin AYDEMİR, Ali ARSLAN</b>	027-034
6.	Three Previously Unseen Genotypes Detected in IGFBP - 3 Gene in Buffalo Breed Mandalarda IGFBP-3 Geninde Daha Önce Görülmemiş Üç Genotip Tespit Edildi <b>Yusuf ÖZŞENSOY, İnanç BARAL</b>	035-040
7.	Evaluation of the Usage of Wafer Waste as an Easily Soluble Carbohydrate Source in Alfalfa Silage Yonca Silajında Kolay Çözünebilen Karbonhidrat Kaynağı Olarak Gofret Atıklarının Kullanımının Değerlendirilmesi <b>Sadık Serkan AYDIN</b>	041-046
8.	Calgary-Cambridge Kılavuzlarında yer alan becerilerin özerklik ilkesi kapsamında değerlendirilmesi Evaluation of the skills in the Calgary-Cambridge Guides within the scope of autonomy <b>Aytaç ÜNSAL ADACA</b>	047-052
9.	The Effect of the Addition of Different Rates of Sumac ( <i>Rhus coriaria</i> ) Powder to Maize on Silage Fermentation and Aerobic Stability Mısır Silajına Farklı Oranlarda Sumak ( <i>Rhus coriaria</i> ) Tozu İlavesinin Silaj Fermantasyonu ve Aerobik Stabilité Üzerine Etkisi <b>Besime DOĞAN DAŞ</b>	053-057
10.	Broiler Rasyonlarına Probiyotik ile Zencefil ( <i>Zingiber officinale</i> ) İlavesinin Besi Performansı, Karkas Parametreleri ve Et Kalitesi Üzerine Etkisi The Effect of Additional Probiotic and Ginger ( <i>Zingiber officinale</i> ) to Broiler Rations on Growth Performance, Carcass Parameters, and Meat Quality <b>Nurcan KIRAR, Faruk BOZKAYA, Mehmet Osman ATLI, Mehmet AVCI</b>	058-066
11.	Kınalı Keklik ( <i>Alectoris chukar</i> ) Sirinks’inde Desmin, Vimentin ve Laminin Lokalizasyonu Localization of Desmin, Vimentin, and Laminin in the Syrinx of the Chukar Partridge ( <i>Alectoris chukar</i> ) <b>Bayram BAYRAM, Uğur TOPALOĞLU, Nurşin AYDIN, Fatma ÇELENK</b>	067-074
12.	Assessment on the “Tail Pull Injuries”: Case Series of 8 Cats Kuyruk Çekme Yaralanmaları” Üzerine Değerlendirme: 8 Kedilik Vaka Serisi <b>Emine ÇATALKAYA, Sadık YAYLA, Semih ALTAN, Berna ERSÖZ KANAY, Nahit SAYLAK, Şimal HATİPOĞLU</b>	075-079

13.	The Isolation and Examination of the Host Specificity of Local Bacteriophages for Use Against <i>Brucella abortus</i> <i>Brucella abortus</i> 'a Karşı Yerel Bakteriyofaj İzolasyonu ve Konakçı Spesifitesinin Değerlendirilmesi <b>Songül ÖTKÜN, Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK, Ahmet Murat SAYTEKİN</b>	080-085
14.	Investigation of the Role of Some Selected Virus Species in Abnormality of Calves Buzağı Anomalilerinde Seçilen Bazı Virüs Türlerinin Rolünün Araştırılması <b>Sümeyye BABACAN, Hasan ABAYLI, Şükrü TONBAK, Kenan Çağrı TÜMER, Eren POLAT, Mustafa İSSİ</b>	086-092
15.	Yumurtacı Tavuklarda Tüy Kalitesi ve Göğüs Kemiği Eğikliği ile Bazı Verim Özellikleri Üzerine Canlı Ağırlık ve Göğüs Kondisyonunun Etkisi Effects of live body weight and breast condition on plumage quality and keel bone deviation in laying hens <b>Gürkan ÖZKAN, Metin PETEK</b>	093-100
16.	Köpek Salya Örneklerinden <i>Pasteurella multocida</i> Varlığının PCR ve Kültürel Yöntemlerle Araştırılması Investigation for the Presence of <i>Pasteurella multocida</i> in Dog Saliva Samples by PCR and Cultural Methods <b>Serdal TARHANE</b>	101-106
17.	İskenderun Körfezi'nden Yakalanan Ahtapotlarda Bisfenol A Düzeyleri Bisphenol A Levels in Octopus Caught From Iskenderun Bay <b>Hatice Kübra SÖNMEZATEŞ, Erdinç TÜRK</b>	107-111
18.	The Effects of Regular Treadmill Exercise on Some Blood Parameters in Diabetes Mellitus Diabetes Mellitus'ta Düzenli Koşu Bandı Egzersizinin Bazı Kan Parametreleri Üzerindeki Etkisi <b>Canan CEYLAN, Mehmet ÖZSAN, Nurcan DÖNMEZ</b>	112-117
<b>Derleme/Review</b>		
19.	Mikrobiyolojide En Yaygın Moleküler Tanı Yöntemi: Polimeraz Zincir Reaksiyonu The Most Common Molecular Diagnostic Method in Microbiology: Polymerase Chain Reaction <b>Oğuz Kağan TÜREDİ, Esra ŞEKER</b>	118-125
20.	Kedi ve Köpeklerde Prepubertal Gonadektomi Prepubertal Gonadectomy in Cats and Dogs <b>İlknur PİR YAĞCI</b>	126-133



## Türkiye’de Karadeniz Bölgesindeki Koyunlarda Mavidil Enfeksiyonunun Seroprevalansı

Hanne Nur KURUÇAY<sup>1,a,\*</sup>, Bahadır MÜFTÜOĞLU<sup>2,b</sup>, Cüneyt TAMER<sup>1,c</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Deney Hayvanları Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0001-5157-2090

<sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-7789-1038

<sup>c</sup>ORCID: 0000-0003-3240-8425

**Geliş Tarihi:** 07.11.2022

**Kabul Tarihi:** 30.01.2023

**Bu makale Nasıl kaynak gösterilir:** Kuruçay HN, Müftüoğlu B, Tamer C. (2023). Türkiye’de Karadeniz Bölgesindeki Koyunlarda Mavidil Enfeksiyonunun Seroprevalansı. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 9-13, DOI:10.31196/huvfd.1200399.

**\*Yazışma adresi:** Hanne Nur KURUÇAY

19 Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Samsun, Türkiye.

e-mail: kurucayhannenur@gmail.com

Online erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Özet:** Mavidil virusu (MDV) Avrupa’da önemli verim kayıplarına sebep olan vektörlerle nakledilen ve özellikle koyunlarda teratojenik etkiye sahip bir virustur. Bu çalışma koyunlarda Orta Karadeniz Bölgesinde yer alan Samsun, Sinop, Ordu, Giresun ve Amasya illerinde MDV’nin seroprevalansını araştırmak amacıyla yapılmıştır. Her bir ilden 80 adet olmak üzere toplam 400 adet koyundan serum örnekleri toplandı. MDV’ye spesifik antikor varlığını belirlemek için antikor (Ab) ELISA test tekniği kullanıldı. Test sonucunda 10 koyunun (%2,5) MDV (Ab) yönünden pozitif olduğu tespit edildi. Amasya’da %2,5, Sinop’ta %10 oranında seropozitiflik tespit edilirken Samsun, Ordu ve Giresun illerinde seropozitiflik belirlenmedi. Elde edilen veriler MDV enfeksiyonun bölgede düşük seroprevalansa sahip olduğunu göstermektedir. Etkene karşı aşılama yapılmayan Orta Karadeniz Bölgesinde seropozitifliğin tespit edilmesi bölgede aşılama çalışmalarının gerekliliğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** ELISA, Karadeniz, Mavidil, Seroloji.

### Seroprevalence of Bluetongue Infection in Sheep in the Black Sea Region of Turkey

**Abstract:** Bluetongue virus (BTV) is transmitted by vectors that cause significant losses in Europe and has a teratogenic effect, especially in sheep. This study was carried out to investigate the seroprevalence of MDV in Samsun, Sinop, Ordu, Giresun, and Amasya provinces of Turkey's Central Black Sea region. Serum samples were collected from 400 sheep, 80 from each province. Ab ELISA test technique was used to determine the presence of antibodies specific to BTV. As a result of this test, ten sheep (2.5%) were determined to be positive for BTV antibodies. While 2.5% and 10% positivity rates were detected in Amasya and Sinop provinces, no positive samples were found in Samsun, Ordu, and Giresun provinces. The obtained data showed that bluetongue infection had a low seroprevalence in the region of this study. Seropositivity detection of BTV in the Central Black Sea region, where vaccination against the causative agent is not performed, shows the necessity of vaccination studies.

**Keywords:** Black Sea, Bluetongue, ELISA, Serology.

## Giriş

Mavidil (MDV), koyunlar başta olmak üzere sığır, keçi, manda, antilop, geyik ve develer de dahil evcil ve yabancı ruminantları etkileyen, *Culicoides* cinsi sinekler ile nakledilen arboviral bir enfeksiyondur (WOAH, 2021). Vektörler üzerine yapılan araştırmalar, *Culicoides oxystoma* ve *C. imicola*'nın enfeksiyonun yayılmasında başlıca sorumlu vektörler olduğunu göstermiştir (Archana ve ark., 2016; Maheshwari, 2012). Hastalığın etkeni *Sedoreoviridae* ailesinin *Orbivirus* cinsi içerisinde yer almaktadır ve bugüne kadar 32 farklı serotipi tanımlanmıştır (Qi ve ark., 2022). MDV serotiplerinin coğrafi dağılımı çoğunlukla tropikal ve ılıman bölgelerdir (Gibbs ve Grainer, 1994; MacLachlan ve Osburn, 2006). *Culicoides* cinsi sivrisinekler MDV enfeksiyonunun birincil kaynağı olmaya devam etse de MDV'nin bulaşması vektörden bağımsız olarak da gerçekleşebilmektedir. Hem geviş getiren çiftlik hayvanlarında hem de vahşi etoburlarda oral ve transplasental yolla MDV enfeksiyonu tanımlanmıştır (Alexander ve ark., 1994; Backx ve ark., 2009; Gibbs ve ark., 1979). MDV enfeksiyonu yüksek morbidite ve mortalite, döl veriminde azalma, düşük doğum ağırlığı, abortlar, ölü doğumlar, fetal anomaliler, süt veriminde azalma ve kilo kaybı nedenleri ile ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (MacLachlan ve Osburn, 2006). Enfeksiyonun klinik belirtileri ateş, seröz-mukopürülant burun akıntısı, dudaklarda, çene altı bölgeler ile yüzde hiperemi ve ödem, oral mukozada erozyonlar ve ülserler, dilde siyanoz, topallık, solunum güçlüğü ve ölümlü sonuçlanan kas nekrozlarıdır (MacLachlan ve ark., 2008). Enfeksiyon koyun, beyaz kuyruklu geyik, lama, alpaka ve kunduzlarda klinik olarak şiddetli seyretmekle birlikte sığırlarda asemptomatik seyir göstermektedir ve sığırlar hastalığın önemli rezervuarlarıdır (Backx ve ark., 2007 ; MacLachlan ve ark., 2009; Schulz ve ark., 2012). Hastalık ilk olarak 1876'da Güney Afrika'da klinik olarak tanımlanmıştır (Verwoerd, 2009). Vektör hareketleri ve uluslararası hayvan ticaretinin yaygınlaşmasıyla birlikte Asya, Avrupa, Kuzey

Amerika ve Avustralya'da da tanımlanmış ve kıtalararası hastalık olarak kabul edilmiştir (MacLachlan, 2011).

Ülkemizde MDV ilk olarak 1944 yılında tespit edilmiştir (Girgin, 1988). Takip eden yıllarda ülkemizin farklı bölgelerinden enfeksiyonun varlığına yönelik pek çok çalışma yapılmıştır (Azkur ve ark., 2011; Gümüşova, 2021; Bolat, 1986a; Bolat, 1986b; Burgu ve ark., 1984; Duman ve ark., 2009; Ertürk ve ark., 2004; Gür, 2008b; Kulaç ve ark., 2016; Özgünlük, 2009; Ozan ve ark., 2012; Özgünlük ve Cabalar, 2013; Özgünlük, 2019). Bu araştırmanın gerçekleştirildiği coğrafyada rutin aşılama yapılmaması ve enfeksiyonun koyun dışındaki ruminantlarda asemptomatik seyretmesi, bölgede virus varlığının sürmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada MDV enfeksiyonu seroprevalansının Orta Karadeniz Bölgesindeki Samsun, Sinop, Ordu, Giresun ve Amasya illerindeki koyunlarda saptanması ve güncel verilerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Örnekler:** Çalışmamızda Ocak 2018 ile Aralık 2020 tarihleri arasında Orta Karadeniz Bölgesindeki Samsun, Sinop, Ordu, Giresun ve Amasya illerinin her birinden 80 adet olmak üzere, herhangi bir hastalık belirtisi olmayan, aşısız, 1-2 yaşları arasında toplam 400 adet koyundan toplanan ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarında arşivlenen serum örnekleri kullanılmıştır. Kullanılan serum örnekleri Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik Madde 2 (2) b bendinde yer alan "Deneyisel olmayan klinik veteriner hekimliği uygulamaları" maddesi gereği HADYEK iznine tabi değildir. Alınan serumlar 56 °C'de 30 dakika inaktivasyonu yapıldıktan sonra enzim-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) testi yapılana kadar -20 °C'de saklanmıştır.



Şekil 1. Örnekleme yapıldığı Karadeniz Bölgesindeki iller.



**Tablo 1.** İllere göre Mavidil virusu seropozitiflik dağılımı.

İl	Serum adet	Pozitif Serum	Seropozitiflik (%)
Samsun	80	0	0
Sinop	80	8	%10
Ordu	80	0	0
Giresun	80	0	0
Amasya	80	2	%2.5
<b>Toplam</b>	<b>400</b>	<b>10</b>	<b>%2.5</b>

**ELISA:** MDV antikor varlığının tespiti için ticari olarak temin edilen "IDEXX Bluetongue Ab ELISA test kit (katalog numarası: P00450-5)" kullanılarak üretici firmanın belirttiği talimatlara göre uygulandı. Plakalar 450-650 nm okundu. Örnekleme yapıldığı iller Şekil 1'de gösterilmiştir.

### Bulgular

Toplamda 400 adet koyun serum örneği MDV antikor varlığı yönünden test edildi. 400 serum örneğinin 10 tanesi (%2,5) pozitif tespit edildi. İllere göre seropozitiflik oranı ise Sinop 8/80 (%10), Samsun 0/80, Ordu 0/80, Giresun 0/80, Amasya 2/80 (%2,5) olarak tespit edilmiştir. (Tablo 1).

### Tartışma ve Sonuç

MDV enfeksiyonu, çeşitli *Culicoides* türleri tarafından bulaştırılan, evcil ve yabancı geviş getiren hayvanların ekonomik açıdan önemli arboviral hastalığıdır (Mellor ve ark., 2000). MDV, birçok evcil ve yabancı ruminantları enfekte edebilmektedir. Hastalığa en duyarlı türler olan koyunlarda klinik belirtiler daha şiddetli seyretmektedir. Keçiler ve sığırlar enfeksiyona duyarlı olmakla birlikte hastalık her iki türde de hafif veya subklinik seyir göstermektedir. Sığırlar koyunlardan çok daha uzun süre viremi göstermekte ve enfeksiyonun rezervuarı olarak kabul edilmektedir (Bonneau ve ark., 2002; Maclachlan ve ark., 2009; Zanella ve ark., 2013). MDV, hızlı bir yayılım göstermesi ve küresel ölçekte önemli ekonomik kayıplara sebep olması nedeniyle de Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'nün (WOAH) bildirim zorunlu hastalıklar listesinde yer almaktadır (WOAH, 2021).

MDV enfeksiyonu Avrupa'da ve Türkiye'de de yaygın olarak görülmektedir. Ülkemizde enfeksiyonun koyunlardaki varlığına yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Şu ana kadar yapılan serolojik çalışmalarda farklı oranlarda seropozitiflikler saptanmıştır.

Bulut ve ark. (2006) Konya ve Burdur'da toplam 381 koyun serumu kullanarak yaptıkları çalışmada sırasıyla %17,1, %1,5 oranında seropozitiflik tespit etmişlerdir. Güneydoğu Bölgesinde 684 koyunda yapılan bir çalışmada %29,5 oranında seropozitiflik bildirilmiştir (Gür, 2008b). Afyonkarahisar'da 568 koyunla yapılan çalışmada %24,8 seropozitiflik tespit edilmiştir (Gür, 2008a). Albayrak ve Ozan (2010), Karadeniz Bölgesinde 200 adet koyun serumunda %3

seropozitiflik bildirmiştir. Kırıkkale yöresinde küçük ruminantlarda yapılan bir çalışmada koyunlarda %49,8 seropozitiflik belirlenmiştir (Azkur, 2011). Şanlıurfa yöresindeki koyunlarda yapılan bir başka çalışmada %87,50 seroprevalans tespit edilmiştir (Özgünlük ve Çabalar, 2013). Alpay ve ark. (2014), bir ada ekosistemi olan Gökçeada'da yaptıkları çalışmada koyunlardaki seropozitifliği %5,6 olarak tespit etmişlerdir. Yavru ve ark.(2015), Karaman'da bulunan koyun işletmelerinde yaptıkları çalışmada %33,14 oranında seropozitiflik bildirmişlerdir. Kars ilinde 460 koyunda yapılan bir çalışmada %10,65 seropozitiflik tespit edilmiştir (Yılmaz ve ark., 2015). Çelik ve Şahin (2019), Siirt ilinde 465 koyunda %73,12 seroprevalans bildirmişlerdir. Karadeniz Bölgesinde köpek, koyun, keçi ve sığırlarda yapılan bir başka çalışmada koyunlarda %8,6 oranında pozitiflik tespit edilmiştir (Gümüşova, 2021).

Bu çalışmada MDV enfeksiyonunun, Karadeniz Bölgesinde yer alan Samsun, Sinop, Ordu, Giresun ve Amasya illerindeki seroepidemiolojisi araştırıldı. Çalışma sonucunda örneklenen illerde genel seropozitiflik oranı %2,5 olarak saptandı. Çalışmamızda örneklenen illerden Sinop'ta %10, Amasya'da ise %2,5 seropozitiflik tespit edildi. Elde edilen bu sonuç, hem Karadeniz Bölgesinde yapılan önceki çalışmalar, hem de ülke genelinde yapılan çalışma sonuçları ile karşılaştırıldığında şu anda enfeksiyonun bölgede oldukça düşük bir seroprevalansa sahip olduğunu göstermektedir. Etkenin taşıyıcı vektörünün geliştiği iklim koşulları göz önüne alındığında ülkemizde özellikle Ege ve Güneydoğu bölgelerinde tespit edilen yüksek seropozitiflik oranına karşın bölgemizde tespit ettiğimiz düşük oran arasındaki farkın tutarlı olduğu görüşündeyiz. Örnekleme yapılan illerden Sinop ve Amasya'da pozitiflik tespit edilmesi bu bölgede bulunan ırmak, çay, akarsu ve göllerin varlığına bağlı olarak vektörlerin üremesi için uygun koşulları oluşturmakta ve bu alanda vektörlerin yaygın olabileceğinin bir göstergesi olarak düşünülmektedir.

Sığırların, MDV enfeksiyonunda rezervuar rol oynamasının da elde ettiğimiz pozitif sonuç üzerinde bir etkisi olduğu düşünülebilir. Sığırlarda vireminin uzun sürmesi ve taşıyıcı vektörün havanın soğuk olduğu kış dönemlerini sığırlarda geçirmesi koyunlar için risk oluşturmaktadır. Ayrıca virusun mekanik yol dışında transplasental yolla da bulaşabildiği göz önüne alındığında enfekte anneden doğan buzağılarda enfeksiyon oluşturabilmektedir. Aynı zamanda enfekte boğaların da veneral yolla virus bulaştırabileceği

bilinmektedir. Bu bağlamda sığırlarda oluşabilecek her türlü MDV enfeksiyonu koyunlar için risk teşkil edebilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar, bölgenin iklim yapısı göz önüne alındığında hastalığın taşıyıcı vektörünün bu bölgedeki sirkülasyonunun düşük olduğunu düşündürmektedir. Enfeksiyonun seroprevalansı her ne kadar bölgemizde düşük olsa da ülkemizin coğrafi yapısı ve iklim koşulları, virusun taşıyıcısı olan Culicoides vektörleri için uygun koşullara sahiptir.

Sonuç olarak hem büyükbaş hem de küçükbaş hayvancılık için ciddi ekonomik kayıplara yol açabilme potansiyeline sahip olan MDV'nin, kontrollü hayvan hareketi, vektör mücadelesi ve etkili rutin aşılama çalışmalarıyla kontrol altına alınabileceği ve enfeksiyonla ilgili sığırları da içine alan daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiği görüşündeyiz.

### Çıkar çatışması

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

### Etik izin

Bu çalışma "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 2 (2) gereği HADYEK iznine tabi değildir.

### Finansal destek

Bu çalışma herhangi bir kurum/kuruluş tarafından desteklenmemiştir.

### Benzerlik Oranı

Makalenin benzerlik oranının sisteme yüklenen raporda belirtildiği gibi %8 olduğunu beyan ederiz.

### Yazar Katkıları

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

### Kaynaklar

Albayrak H, Ozan E, 2010: Orta Karadeniz Bölgesinde ruminant ve tek tırnaklılarda kan emici sineklerle nakledilen bazı arboviral enfeksiyonların seroprevalansı. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 16 (1), 33-36.

Alexander KA, MacLachlan NJ, Kat PW, House C, O'Brien SJ, Lerche NW, Osburn BI, 1994: Evidence of natural bluetongue virus infection among African carnivores. *Am J Trop Med*, 51 (5), 568.

Alpay G, Tuncer P, Yeşilbaş K, 2014: Bir ada ekosistemindeki siğir, koyun ve keçilerde bazı viral enfeksiyonların serolojik olarak araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 61, 43-48.

Archana M, D'Souza PE, Prasad CR, Byregowda SM, 2016: Prevalence of different species of Culicoides in Bangalore rural and urban districts of South India. *J Parasit Dis*, 40 (3), 591-604.

Azkur AK, Gazyağcı S, Aslan M, 2011: Serological and epidemiological investigation of bluetongue, maedi-visna and caprine arthritis-encephalitis viruses in small ruminant in Kırıkkale district in Turkey. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 17 (5), 803-808.

Backx A, Heutink CG, Van Rooij EMA, Van Rijn PA, 2007: Clinical signs of bluetongue virus serotype 8 infection in sheep and goats. *Vet Rec*, 161 (17), 591.

Backx A, Heutink R, Van Rooij E, Van Rijn P, 2009: Transplacental and oral transmission of wild-type bluetongue virus serotype 8 in cattle after experimental infection. *Vet Microbiol*, 138 (3-4), 235-243.

Bolat Y, 1986a: Elazığ, Diyarbakır ve Şanlıurfa illerinde koyunların mavidil hastalığının yayılması üzerine serolojik araştırmalar. *Selçuk Üniv Vet Fak Derg*, 2, 103-112.

Bolat Y, 1986b: Investigation of antibodies of the Bluetongue diseases in sera of cattle and goats in Elazığ. *DOĞA Tr J Vet Sci*, 10 (3), 235-238.

Bonneau KR, DeMaula CD, Mullens BA, MacLachlan NJ, 2002: Duration of viraemia infectious to Culicoides sonorensis in bluetongue virus-infected cattle and sheep. *Vet Microbiol*, 88 (2), 115-125.

Bulut O, Yavru S, Yapıcı O, Simsek A, Kale M, Avcı O, 2006: Serological investigation of bluetongue virus infection by serum neutralization test and ELISA in sheep and goats. *Bull Vet Inst Pulawy*, 50 (3), 305.

Burgu İ, Öztürk F, Akça Y, 1984: Tahirova devlet üretme çiftliği koyunlarında viral enfeksiyonlar üzerine serolojik araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 31, 167-179.

Çelik ÖY, Şahin T, 2019: Investigation of Seroprevalence of Bluetongue Diseases in Sheep in the Province of Siirt. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 12 (1), 53-56.

Duman R, Yavru S, Kale M, 2009: Virological and serological investigations of bluetongue virus (BTV) infection in sheep in Konya region. *J Anim Vet Adv*, 8 (11), 2399-2403.

Ertürk A, Tatar N, Kabaklı O, İncoğlu S, Çizmecici SG, Barut FM, 2004: The current situation of bluetongue in Turkey. *Vet Ital*, 40 (3), 137-140.

Gibbs EP, Greiner EC, 1994: The epidemiology of bluetongue. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 17, 207-220.

Gibbs EPJ, Lawman MJP, Herniman KAJ, 1979: Preliminary observations on transplacental infection of bluetongue virus in sheep-A possible overwintering mechanism. *Res Vet Sci*, 27: 118-120.

Girgin H, 1988: Türkiye'deki Koyunların Mavidil Hastalığının Serolojik, Etiyolojik ve Patolojik Durumu Üzerinde Araştırmalar. *Et Vet Microbiol*, 6 (3), 13-24.

Gümüşova S, 2021: Köpek, siğir, keçi ve koyunlarda mavi dil seroprevalansı. *MAE Vet Fak Derg*, 6(3), 99-103.

Gür S, 2008a: Afyonkarahisar ilinde koyunlarda mavi dil virus enfeksiyonunun kompetatif elisa ile araştırılması. *EJVS*, 24 (1), 35-39.

Gür S, 2008b: A serological investigation of bluetongue virus (BTV) in cattle, sheep and gazella subgutturosa subgutturosa in South-Eastern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 40, 217-221.

Kulaç E, Kırmızıgül AH, Yıldırım Y, 2016: Rize Yöresindeki Sığırlarda Mavi Dil Enfeksiyonunun Seroprevalansı. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 11 (2), 151-158.

MacLachlan NJ, 2011: Bluetongue: history, global epidemiology, and pathogenesis. *Prev Vet Med*, 102 (2), 107-111.

- MacLachlan NJ, Crafford JE, Vernau W, Gardner IA, Goddard A, Guthrie AJ, Venter EH, 2008: Experimental reproduction of severe bluetongue in sheep. *Vet Pathol*, 45 (3), 310–315.
- MacLachlan NJ, Drew CP, Darpel KE, Worwa G, 2009: The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J Comp Pathol*, 141 (1), 1–16.
- MacLachlan NJ, Osburn BI, 2006: Impact of bluetongue virus infection on the international movement and trade of ruminants. *J Am Vet Med A*, 228 (9), 1346–1349.
- Maheshwari G, 2012: Current status of bluetongue disease, its vector and pathogenesis in India. *PNAS India Section B Bio Sci*, 82 (4), 463-475.
- Mellor PS, Boorman J, Baylis M, 2000: Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol*, 45 (1), 307-340.
- Ozan E, Turan HM, Albayrak H, Cavunt A, 2012: Serological determination of pestivirus, bluetongue virus and peste des petits ruminants virus in small ruminants in Samsun province of Turkey. *Ataturk Univ Vet Bilim Derg*, 7 (1), 27-33.
- Özgünlük İ, 2009: A serologic investigation of bluetongue virus serotypes (BTV-9, BTV-16) in cattle in the Southeastern Anatolia Project Area in Turkey. *J Anim Vet Adv*, 8 (12), 2613-2616.
- Özgünlük İ, 2019: Aydın Yöresindeki Sığırlarda Mavidil Enfeksiyonunun (BTV serotip 4, 9 ve 16) Serolojik Araştırılması. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 8 (2): 180-185.
- Özgünlük İ, Çabalar M, 2013: Şanlıurfa Yöresindeki Koyun ve Keçilerde Mavidil Virus Antikorlarının Araştırılması. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 2 (1), 12-17.
- Qi Y, Wang F, Chang J, Jiang Z, Sun C, Lin J, Wu J, Yu L, 2022: Genetic characteristics and pathogenicity of the first bluetongue virus serotype 20 strain isolated in China. *Transbound Emerg Dis*, 69(5), e2164-e2174.
- Schulz C, Eschbaumer M, Rudolf M, König P, Keller M, Bauer C, Hoffmann B, 2012: Experimental infection of South American camelids with bluetongue virus serotype 8. *Vet Microbiol*, 154 (3-4), 257-265.
- Verwoerd DW, 2009: History of bluetongue research at Onderstepoort: transboundary diseases. *Onderstepoort J Vet*, 76 (1), 99-102.
- WOAH-OIE. World Organisation for Animal Health: Terrestrial Manuel 2021.Chapter 3.1.3.-Bluetongue (Infection with bluetongue virus).
- Yavru S, Avcı O, Yapıcı O, Bulut O, Simsek A, Kale M, 2015: A serological investigation of Blue Tongue Virus infection in sheep breeds in Karaman province. *EJVS*, 31 (4), 214-217.
- Yılmaz V, Yıldırım Y, Coşkun N, 2015: Serological investigation of Bluetongue virus and Rift valley fever virus infections in sheep in Kars province of Turkey. *Van Vet J*, 26 (3), 119-122.
- Zanella G, Martinelle L, Guyot H, Mauroy A, De Clercq K, Saegerman C, 2013: Clinical pattern characterization of cattle naturally infected by BTV-8. *Transbound Emerg Dis*, 60 (3), 231-237.



## Postnatal Gelişme Dönemlerinde Capsaicin Uygulanan Fare Testislerinde TGF Beta-1'in İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu

Cansel Güzin ÖZGÜDEN AKKOÇ<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D., Bursa, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-0712-0892

Geliş Tarihi: 02.10.2022

Kabul Tarihi: 28.02.2023

**Bu makale Nasıl kaynak gösterilir:** Özgüden Akkoç CG. (2023). Postnatal Gelişme Dönemlerinde Capsaicin Uygulanan Fare Testislerinde TGF Beta-1'in İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 14-20, DOI:10.31196/huvfd.1228436.

**\*Yazışma adresi:** Cansel Güzin ÖZGÜDEN AKKOÇ  
Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D., Bursa, Türkiye.  
e-mail: cozuguden@uludag.edu.tr

Online erişim adresi:

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Özet:** Transforme edici büyüme faktörü beta-1 (TGF Beta-1) testiküler fonksiyonların parakrin ya da otokrin düzenleyicilerinden biridir. Bu çalışmada, postnatal gelişme sürecinde Capsaicin (CAP) uygulanan farelerin testislerinde TGF Beta-1'in lokalizasyonu incelendi. Çalışmada 60 adet Swiss albino soyu erkek fare kullanıldı. Deney grubundaki 21 günlük farelere(n:30)75 gün boyunca her gün deri altı yolla 1mg/kg dozunda CAP enjekte edildi. Deney ve kontrol gruplarından 10'ar hayvan, 35. günü (puberte dönemi), 50. günü (puberte sonrası dönem) ve 75. günü (erişkin dönem) temsil edecek şekilde gruplara ayrıldı. Örneklenen testislerin tartımı sonrası rutin histolojik prosedür uygulandı. Çalışma süresince her gün kontrol ve deney grubu hayvanların canlı ağırlıkları tartıldı. Tüm deney gruplarındaki hayvanların canlı ağırlık ortalamalarının kontrol gruplarına oranla daha fazla olduğu ve bu iki grup arasında  $p<0,05$  düzeyinde istatistiki önem saptandı. 35 ve 50 günlük deney gruplarının testis ağırlıklarının kontrol gruplarına oranla daha fazla olduğu gözlemlendi. Gözlenen farklılıklar arasında istatistiki bir öneme rastlanmadı. TGF Beta-1 immunreaksiyonu kontrol ve deney gruplarında, farklı boyanma yoğunluklarında, Leydig hücrelerinde ve genç spermatidlerde gözlenirken Sertoli hücrelerinde, spermatogonyumlarda ve erişkin spermatidlerde immunreaksiyon gözlenmedi. Genç spermatidlerdeki boyanma yoğunluğu her iki grupta da hemen hemen benzerdi, fakat kontrol gruplarında boyanma yoğunluğu yaş ile artarken deney gruplarındaki bu artış 75 günlük grupta gözlenmedi. Leydig hücrelerindeki boyanma yoğunluğu ise deney gruplarında yaş ile artış gösterirken kontrol gruplarında farklı boyanma yoğunlukları saptandı. Sonuç olarak CAP'ın, spermatogenez sırasında Leydig hücrelerindeki reseptörüne bağlanarak TGF Beta-1 immunreaksiyonunu arttırdığı sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Capsaicin, Fare, İmmunohistokimya, Testis, TGF Beta-1.

### The Immunohistochemical Localization of TGF Beta-1 in Capsaicin Injected Mice Testis at the Postnatal Development Period

**Abstract:** Transforming growth factor beta-1 (TGF Beta-1) is one of the paracrine or autocrine regulators of testicular function. In this study, we investigated the effect of Capsaicin (CAP) on the localization of TGF Beta-1 in the testis of mice treated with CAP during postnatal development. In the study, 60 Swiss albino male mice were used. The 21-day-old mice (n:30) in the experimental group were injected with CAP at 1 mg/kg subcutaneously daily for 75 days. Ten animals, each from the experimental and control groups, were divided into groups representing the 35<sup>th</sup> day (puberty), 50<sup>th</sup> day (post-puberty), and 75<sup>th</sup> day (adult). After weighing the testis, a routine histological procedure was performed. The body weights of the control and experimental group animals were measured daily during the study period. The mean body weights of all experimental groups were higher than the control groups, and we determined statistical significance at  $p<0.05$  level between the groups. The mean testicular weights of the 35<sup>th</sup> and 50<sup>th</sup> experimental groups were higher than the 35<sup>th</sup> and 50<sup>th</sup> experimental groups, except for the 75<sup>th</sup> experimental group. No statistical significance was found between the groups. TGF Beta-1 immunoreaction was observed in Leydig cells and round spermatids at different intensities in all experimental and control groups. In contrast, no immunoreaction was observed in Sertoli cells, spermatogonia, and elongated spermatids. The staining intensity in round spermatids was almost similar in both groups. Still, the staining intensity increased with age in the control groups, while this increase in the 75<sup>th</sup> experimental groups was not observed. The staining intensity in Leydig cells increased with age in the experimental groups, while different staining intensities were found in the control groups. In conclusion, CAP increased TGF beta-1 immunoreaction by binding to its receptor in Leydig cells during spermatogenesis.

**Keywords:** Capsaicin, Immunohistochemistry, Mouse, Testis, TGF Beta-1.

## Giriş

TGF Beta, 1980 yılında epitel hücre kültüründe izole edilmiştir. TGF Beta ismini epitel hücrelerinde *in vitro* ortamda oluşturduğu fenotipik transformasyondan dolayı almıştır (Lui ve ark., 2003). TGF Beta ailesi TGF Beta-1, TGF Beta-2, TGF Beta-3, TGF Beta-4 ve TGF Beta-5 şeklinde alt gruplara ayrılır (Ingman ve Robertson, 2002). Bunlardan sadece TGF Beta-1'in, TGF Beta-2'nin ve TGF Beta-3'ün varlıklarımemele testislerinde saptanmıştır. Erkek genital sistemi hem LH ve FSH gibi gonadotropinlerin hem de TGF Beta gibi büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır. Memeli testislerinde izole edilen TGF Betalar, testislerin gelişiminde, ekstrasellüler matriks sentezinde, steroidogeneziste ve spermatogeneziste rol oynadıkları gösterilmiştir (Itman ve ark., 2006).

Acı kırmızı biberin etken maddesi olan CAP, beyaz renkte, kokusuz ve acı özellikleri olan bir alkaloiddir (Sharma ve ark., 2013). CAP'in organizmada genital (Erdost ve ark., 2007; İlhan ve Erdost, 2013; Özer ve ark., 2006; Özgüden-Akkoç ve ark., 2018; Tütüncü ve Özfiliz, 2011), gastrointestinal (Özgüden-Akkoç ve ark., 2017; Srinivasan, 2016), kardiovasküler (Sharma ve ark., 2013), endokrin (Erdost ve ark., 2006) ve solunum sistemleri (Toukan ve ark., 2022) üzerine pek çok etkisi olduğu için tıp alanında kullanımı yaygınlaşmıştır (Adaszek ve ark., 2019). CAP'in etkisi öncelikli olarak dokuya, uygulama dozuna ve uygulama şekline göre farklılıklar göstermektedir (Oh ve ark., 2003). Erkek genital sistem üzerine yapılan çalışmalarda, CAP'in horozlarda (Özer ve ark., 2006) ve farelerde (Erdost ve ark., 2007) testis gelişimini hızlandırdığı bildirilmiştir. Bunun yanı sıra yapılan bir *in vitro* çalışmada CAP'in doza bağlı olarak mitotik germ hücreleri üzerine etkili olduğu da gösterilmiştir (Mizrak ve ark., 2008). Sunulan bu çalışmada, CAP'in, farklı gelişme dönemlerindeki farelerin testislerinde, erkek genital sistem organlarının gelişmesinde rol alan TGF Beta-1'in lokalizasyonu üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Deney Planı:** Çalışmada standart laboratuvar koşullarında tutulan (oda sıcaklığı 21–23 °C, nem %50–60, 12 saat aydınlık/karanlık siklusu) 21 günlük Swiss albino soyu 60 adet erkek fare kullanıldı. Çalışmadaki tüm deneysel işlemler Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (1.06.2004/1). İlk olarak fareler hiçbir enjeksiyon yapılmayan kontrol grubu (n=30) ve 1 mg/kg dozda CAP (Sigma, M 2028) uygulanan deney grubu (n=30) olarak iki ana gruba ayrıldı. Hayvanların her gün canlı ağırlıkları tartıldı. 75 gün boyunca her gün deney grubundaki farelere 1mg/kg dozdaki CAP, steril serum fizyolojik içerisinde çözündürülüp, çözelti içerisine %1 Tween 20 eklenerek 0,3 ml/fare şeklinde deri altı yolla verildi (Erdost ve ark., 2007). Kontrol ve deney gruplarındaki fareler, 35, 50 ve 75. günlerde dietil eter anestezisi altında testisleri alınarak testislerin tartımları yapıldı. Alınan testisler Bouin tespitine konuldu. Tespit işleminin ardından dereceli alkol serisinden geçirilen dokular, parafine gömüldü ve 5µm'lik kesitler alındı ve lizine kaplı lamlara çekildi. Testislerin morfolojik özelliklerinin

incelenmesi amacıyla Crossmon'un üçlü boyama yöntemi uygulandı.

**İmmunohistokimyasal Boyama Prosedürü:** Parafin kesitlerde TGF Beta-1'in immunohistokimyasal lokalizasyonunun gösterilmesi amacıyla indirekt streptavidin-biotin-peroksidaz kompleks tekniği kullanıldı. Deparafinize edilen kesitlerin suyu giderildikten sonra antijenin açığa çıkartılması için distile su içerisinde hazırlanan %0.05 Saponin (Serva, Heidelberg, Germany) solüsyonu içerisinde, oda ısısında 20 dk. bekletildi. Fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkamayı takiben endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için, dokular metanol ile hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu içerisinde oda ısısında 10 dk. bekletildi. Spesifik olmayan protein bağlanmalarını önlemek amacıyla sekonder kit içerisindeki kullanıma hazır bloklayıcı solüsyonu ile (Histostain® Plus Rabbit Primary Kit, 85-6743, Zymed Laboratories, San Francisco, CA) oda ısısında 60 dk. inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kesitlere 1/750 oranında sulandırılmış primer antikor (rabbit poliklonal TGF Beta-1, sc-146, SantaCruz, CA) damlatılarak +4 °C'de bir gece bekletildi. Bu arada negatif kontrol grubu kesitlerine sadece antikor sulandırma solüsyonu damlatıldı. PBS ile yıkamayı takiben kesitlere kullanıma hazır biotinlenmiş sekonder antikor (Histostain® Plus Rabbit Primary Kit, 85-6743, Zymed Laboratories, San Francisco, CA) damlatılarak oda sıcaklığında 15 dk. bekletildi ve yıkamayı takiben kullanıma hazır streptavidin-HRP komplekste (Histostain® Plus Rabbit Primary Kit, 85-6743, Zymed Laboratories, San Francisco, CA) oda sıcaklığında 15 dk. inkübe edildi. 3,3'-diaminobenzidine (DAB-Zymed Laboratories, San Francisco, CA) ile kromojenize edilen kesitlere Harris hematoksilen (HHS16, Sigma Aldrich, Germany) ile karşıt boyama yapıldı ve entellan ile kapatıldı.

**Değerlendirme:** İmmunohistokimyasal değerlendirme iki farklı araştırmacı tarafından (AÖ, CGÖA) yapıldı. Boyanan kesitler ışık mikroskobu ile (Nikon eclipse 80'i, Tokyo, Japonya) incelendi. Değerlendirmede öncelikli olarak hedef hücrelerin boyanıp boyanmamasına, daha sonra da boyanma yoğunluğuna bakıldı. Boyanma yoğunluğu; zayıf, orta, şiddetli boyanma ve boyanmama şeklinde yapıldı (Adams ve ark. 1999).

**İstatiksel Analizler:** Çalışma bulgularının değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis Testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı.  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Kontrol ve deney grubunu oluşturan hayvanlarda deney sürecinde ölüm gözlenmedi. Hayvanların canlı ağırlık oranları karşılaştırıldığında tüm deney gruplarındaki hayvanların ağırlıklarının daha fazla olduğu saptandı ve gruplar arasında  $p < 0,05$  düzeyinde istatistiki öneme rastlandı (Tablo 1). Hayvanların testis ağırlıkları karşılaştırıldığında ise 35 ve 50 günlük deney gruplarındaki hayvanların testis ağırlıklarının daha fazla olduğu görüldü. 75 günlük deney grubunda ise testis ağırlıklarında bir azalma saptandı fakat gruplar arasında istatistiki bir önem saptanmadı (Tablo 1).

**Tablo 1.** Kontrol ve deney gruplarının canlı ağırlık ve testis ağırlıkları ortalamaları.

	35 günlük		50 günlük		75 günlük		
	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney	
	n	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	
Canlı Ağırlık (g)	10	20.6 ± 0.834	27.7 ± 0.834*	27.1 ± 0.834	32.8 ± 0.834*	28.6 ± 0.834	32.9 ± 0.834*
Testis Ağırlığı (g)	10	0.051 ± 0.003	0.056 ± 0.003	0.079 ± 0.003	0.093 ± 0.003	0.098 ± 0.003	0.088 ± 0.003

\* : İki değer arasındaki önem (p<0,05).

Crossmon'un üçlü boyama yöntemi ile boyanan preparatlar incelendiğinde gruplar arasında testislerin histolojik yapısında bir farklılık bulunmadı. Tüm gruplara ait farelerin testis dokularının dışarıdan tunika albuginea ile çevrili olduğu, bunun hemen altında tubulus seminiferus kontortusların yer aldığı gözlemlendi. Tubulus seminiferus kontörtusların içerisinde çeşitli spermatogenik hücreler görülürken tubulus seminiferus kontortusları çevreleyen peritübüler miyoid hücrelerin varlığı gözlemlendi. Tubulus seminiferus kontortusların arasındaki intersitisiyel alanlarda Leydig hücreleri ve kan damarlarının yer aldığı gözlemlendi (Şekil 1).

TGF Beta-1 immunreaksiyonu, tüm kontrol ve deney gruplarında, intrasitoplazmik olarak genç spermatidlerde ve Leydig hücrelerinde farklı boyanma yoğunluklarında belirlenirken Sertoli hücrelerinde, spermatogonyumlarda, primer spermatositlerde, olgun spermatidlerde ve negatif kontrol preparatlarında immunreaksiyon gözlenmedi. Kontrol ve deney gruplarında Leydig hücrelerindeki immunreaksiyon değerlendirildiğinde, 35 günlük kontrol grubunda immunreaksiyon görülmezken, 35 günlük deney grubunda zayıf immunreaksiyon görüldü (Şekil 2A, 2B). 50 günlük kontrol grubunda immunreaksiyon şiddetli iken deney grubunda orta şiddetli immunreaksiyon saptandı (Şekil 2C, 2D). 75 günlük kontrol grubunda immunreaksiyon orta şiddetli iken deney grubunda immun reaksiyonun şiddetli olduğu belirlendi (Şekil 2E, 2F). Kontrol ve deney gruplarında genç spermatidlerdeki immun reaksiyon değerlendirildiğinde ise 35 günlük deney ve kontrol gruplarında zayıf immun reaksiyon (Şekil 2A, 2B), 50 günlük kontrol ve deney gruplarında orta şiddetli immun reaksiyon görüldü (Şekil 2C, 2D). 75 günlük kontrol grubunda immun reaksiyon şiddetli iken deney grubunda immun reaksiyonun orta şiddetli olduğu saptandı (Şekil 2E, 2F).

## Tartışma ve Sonuç

TGF Beta'lar, memeli testislerinde başta spermatogenez olmak üzere Leydig ve Sertoli hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesi, peritübüler miyoid hücrelerinin organizasyonu gibi testiküler fonksiyonların parakrin ya da otokrin düzenleyicileri olarak görev yapmaktadırlar (Itman ve ark., 2006). Testisler sinirsel innervasyondan son derece zengin organlardır (Eurell ve Frappier, 2006). Sunulan çalışmada kullanılan CAP, reseptörü olan Vanilloid Reseptör 1 (VR1) ile

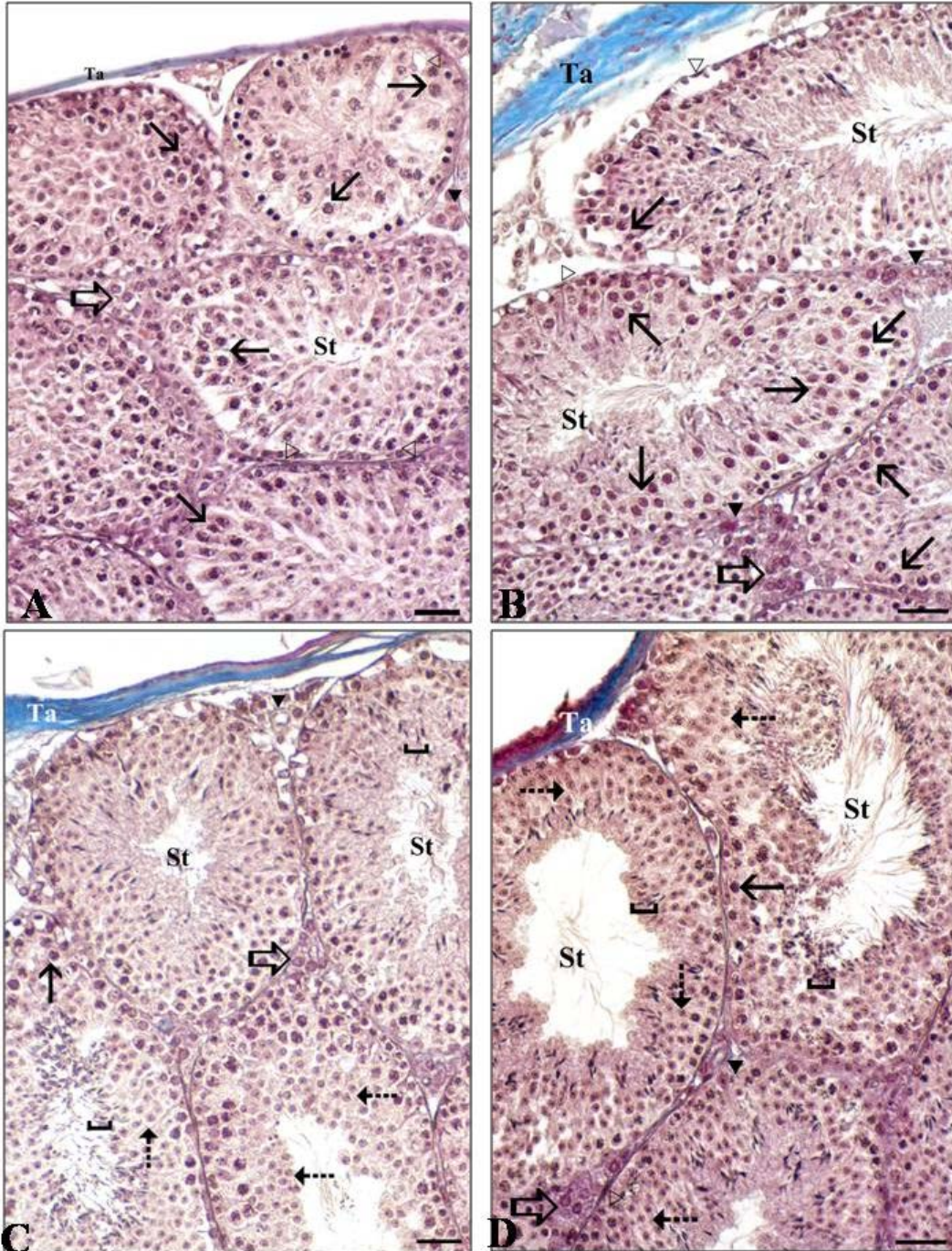
sensorik sinir sonlarından Substans P (SP) ve kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) gibi nöyopeptidlerin salınımını uyararak etki göstermektedir (Holzer,1991). Yapılan literatür taramalarında CAP'ın testislerde TGF Beta-1 üzerine etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, CAP'ın, farklı gelişme dönemlerindeki farelerin testislerinde, TGF Beta-1'in lokalizasyonu üzerine etkisi incelenmiştir.

Sunulan çalışmada, kontrol ve deney gruplarındaki hayvanların canlı ağırlıkları karşılaştırıldığında deney gruplarının canlı ağırlığının daha fazla olduğu gözlemlenmiş ve deney ve kontrol grupları arasında p <0,05 düzeyinde istatistiki öneme rastlanmıştır. Silva ve ark. (2021) insanlarla yaptıkları 6 hafta süren çalışmalarında, günlük 12 mg CAP tüketen deneklerde kontrol grubuna oranla kilo artışı tespit etmişlerdir. Araştırmacıların (Silva ve ark., 2021) bulguları sunulan çalışmanın bulgularını desteklemektedir. Fakat Özer ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada 1 günlük yaştan itibaren yemlerine %1 acı biber ilave edilen, 5 ay süre ile beslenen horozların vücut ağırlıklarında azalma gözlemlenmişlerdir. Çalışmalarda gözlenen bu farklılığın CAP'ın uygulama şekli, uygulama dozu ve uygulama süresinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sunulan çalışmada 35 ve 50 günlük deney gruplarının testis ağırlıklarında kontrollere kıyasla bir artış olduğu gözlemlendi fakat istatistiki bir önem rastlanmadı. Park ve ark.'nın (2017) yapmış oldukları bir çalışmada, CAP uygulamasının fare testislerinde özellikle primer spermatosit, genç ve erişkin spermatid sayılarını arttırarak testis ağırlığını da arttırdığını bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada (Erdost ve ark., 2007) farelerde CAP uygulamasının seminifer tubul gelişim hızının arttırdığı ve bununla birlikte testis ağırlıklarında da artış olduğu bildirilmiştir. Sunulan çalışmanın bulguları bahsedilen çalışmaların (Erdost ve ark., 2007; Park ve ark., 2017) bulguları ile paralellik göstermektedir.

Sunulan çalışmada kontrol ve deney gruplarında, TGF Beta-1 immunreaksiyonu farklı boyanma yoğunluklarında, genç spermatidlerde ve Leydig hücrelerinde saptanmıştır. Kontrol gruplarının genç spermatidlerindeki boyanma yoğunluğunun yaş ile beraber artış gösterdiği görülmüştür. Bazı araştırmacılar (Ingman ve ark., 2002; Mullaney ve Skinner, 1993) TGF Beta-1 immun reaksiyonunu sadece puberte dönemi rat testislerindeki genç spermatidlerde saptadıklarını bildirmişlerdir. Fakat Watrin ve ark.'nın (1991) TGF Beta-1 mRNA'sını erişkin farelerin genç spermatidlerinde eksprese edildiğini bildirmesi aynı zamanda Haagmans ve

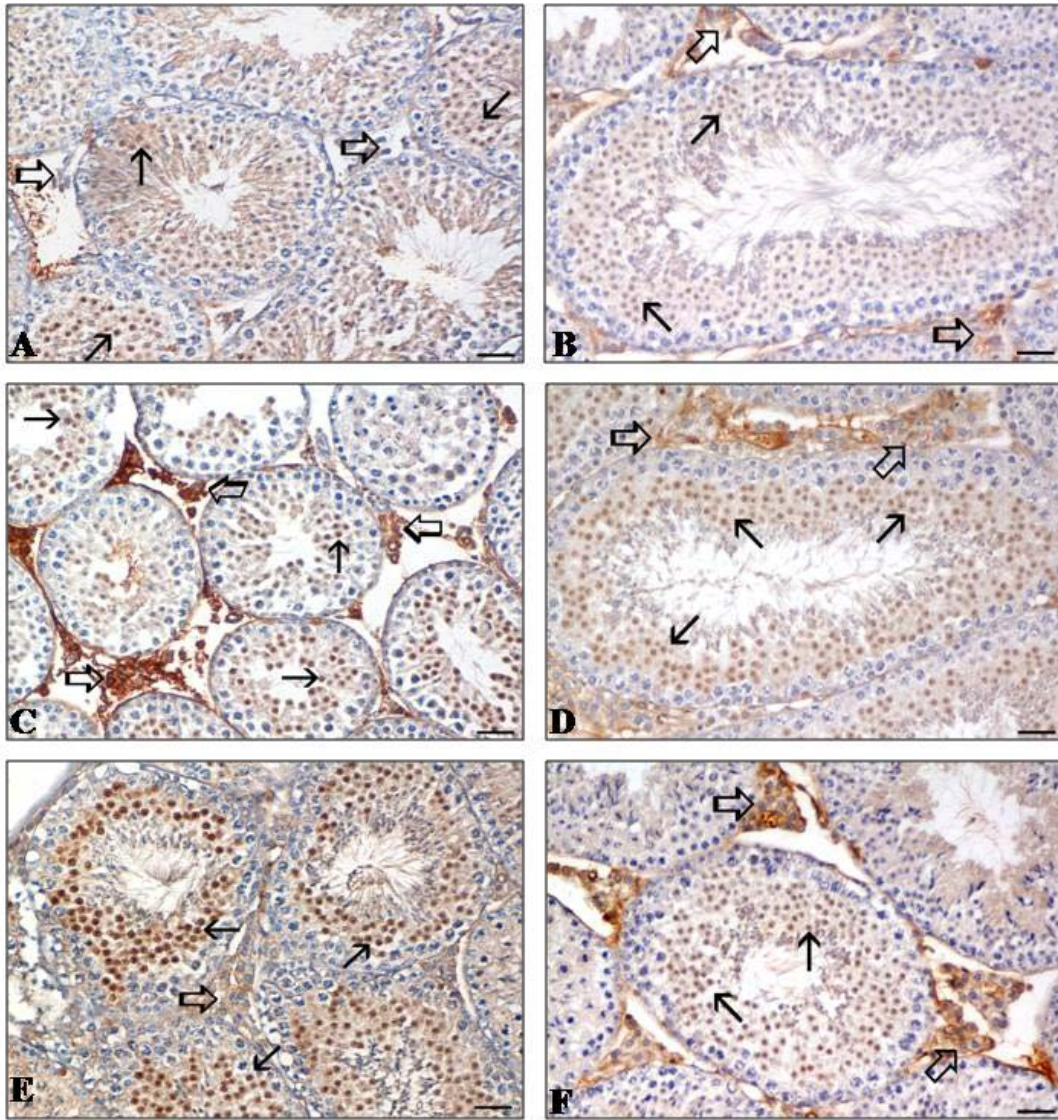
ark.'nın (2003) erişkin ratlar ile yaptıkları çalışmada genç spermatidlerde TGF Beta-1 immun reaksiyonunu göstermesi sunulan çalışmanın kontrol gruplarına ait bulguları desteklemektedir. Sunulan çalışmada, kontrol gruplarından farklı olarak deney gruplarının genç spermatidlerdeki TGF Beta-1 immun boyanma yoğunluğunun özellikle 50 ve 75 günlük gruplarda aynı olduğu gözlenmiştir. Yapılan literatür taramalarında (Jung ve ark., 2004; Lui ve ark., 2003) TGF Beta-

1 sentezindeki artışın spermatogenik hücrelerin mitotik aktivitelerini azalttığını gösteren makalelere rastlanmıştır. Sunulan çalışmada genç spermatidlerdeki TGF Beta-1'in immun boyanma yoğunluğunun 75 günlük kontrol grubunda şiddetli olması bu hücrelerdeki mitotik aktivitenin azaldığını, deney grubunda ise immun boyanma yoğunluğunun kontrol grubuna kıyasla daha zayıf olmasının bu hücrelerde mitotik aktivitenin devam ettiğini düşündürmüştür.



**Şekil 1.** Kontrol ve deney gruplarına ait testis dokularının genel görünümü.

**A:** 35 günlük (puberte) kontrol grubu, **B:** 35 günlük (puberte) deney grubu, **C:** 75 günlük (erişkin) kontrol grubu, **D:** 75 günlük (erişkin) deney grubu, **Ta:** Tunika albuginea, **St:** Tubulus seminiferus kontortus, **↑:** Primer spermatosit, **⇨:** Leydig hücresi, **↑:** Genç spermatid, **▲:** Kan damarı, **△:** Peritübüler miyoid hücre, **┘:** Erişkin spermatid, Masson'un üçlü boyaması, Bar:100µm.



**Şekil 2.** Kontrol ve deney gruplarında TGF Beta-1'in immunohistokimyasal lokalizasyonu.

A: 35 günlük (puberte) kontrol grubu, B: 35 günlük (puberte) deney grubu, C: 50 günlük (puberte sonrası) kontrol grubu, D: 50 günlük (puberte sonrası) deney grubu, E: 75 günlük (erişkin) kontrol grubu, F: 75 günlük (erişkin) deney grubu, ↑: Genç spermatozid, ⇨: Leydig hücresi,,A, C, E için Bar:100µm, B,D,F için Bar:50µm.

Bazı araştırmacılar (Dickson ve ark., 2002; Haagmans ve ark.,2003; Ingman ve Robertson, 2002; Mullaney ve Skinner, 1993) yapmış oldukları çalışmalarda, puberte ve erişkin rat testislerindeki Leydig hücrelerinde TGF Beta-1'i immunohistokimyasal olarak saptamışlar ve boyanma şiddetinin yaşla beraber azaldığını, TGF Beta-1'in Leydig hücrelerinde testosteron salınımını inhibe ettiğini ve DNA sentezini durdurduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da kontrol gruplarındaki Leydig hücrelerinde immun boyanma yoğunlukları değerlendirildiğinde yukarıda bahsi geçen araştırmacılar (Dickson ve ark., 2002; Haagmans ve ark.,2003; Ingman ve Robertson, 2002; Mullaney ve Skinner, 1993) ile benzer bulgular saptanmıştır. Çalışmanın deney gruplarındaki Leydig hücrelerinde ise TGF Beta-1 immun boyanma yoğunluğunun yaşla birlikte arttığı gözlenmiştir. Yapılan bir *in vitro* çalışmada (Lui ve ark., 2003), yüksek

miktardaki TGF Beta-1'in LH sentezini durdurarak Leydig hücrelerinden testosteron inhibe ettiği ve spermatogenik hücrelerin gelişimini düzenlediği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra Erdost ve ark.'nın (2006) kanatlı hayvanlarda yapmış oldukları bir çalışmada, CAP uygulamasının hipofizde LH salınımını arttırdığı ve bu hayvanların kontrol gruplarına oranla daha erken dönemde puberteye girdiklerini göstermişlerdir. Sunulan çalışmada, kontrol gruplarından farklı olarak deney gruplarının Leydig hücrelerinde daha erken dönemde immunreaksiyonun gözlenmesi, CAP uygulamasının sensorik sinir sonlarından SP ve CGRP gibi nörotransmitter maddelerin salınımını uyarak (Holzer, 1991), sinirsel innervasyondan zengin olan testis dokusu üzerine etkili olduğunu ve spermatogenik hücre gelişiminin kontrol grubuna kıyasla daha erken dönemde başladığını düşündürmektedir. Bununla birlikte CAP'ın reseptörü olan



VR1'in Leydig hücrelerinde varlığı düşünüldüğünde (Erdost ve ark., 2007) CAP'ın VR1 aracılığı ile TGF Beta-1'i aktive ederek spermatogenezisi düzenlediği de ileri sürülebilir.

Sonuç olarak sunulan çalışmada, CAP uygulamasının spermatogenez aşamasında, Leydig hücrelerinde TGF Beta-1 immunreaksiyonunu arttırdığı, genç spermatidlerde ise boyanma yoğunluğunu azalttığı saptanmıştır. CAP'ın testislerdeki TGF Beta-1 üzerine olası etkilerinin gösterilmesi için daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

### Çıkar çatışması

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

### Etik izin

Bu çalışma için Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (B.U.Ü HADYEK) 1.06.2004/1 numara ile izin alınmıştır. Ayrıca yazar Araştırma ve Yayın Etiğine uyulduğunu beyan etmiştir.

### Finansal destek

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından 1050348 proje numarası ile desteklenmiştir.

### Benzerlik Oranı

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

### Teşekkür

Bu çalışmada bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen, ebediyete intikal eden kıymetli hocam Prof. Dr. Aytekin ÖZER'e çok teşekkür ediyor, kendisini özlemle ve rahmetle anıyorum.

### Açıklama

19. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresinde (2009) poster bildiri olarak sunulmuştur ve yazarın aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir.

### Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: CGÖA

Tasarım: CGÖA

Denetleme/Danışmanlık: CGÖA

Veri Toplama ve/veya İşleme: CGÖA

Analiz ve/veya Yorum: CGÖA

Kaynak Taraması: CGÖA

Makalenin Yazımı: CGÖA

Eleştirel İnceleme: CGÖA.

### Kaynaklar

- Adams EJ, Green JA, Clark AH, Youngson JH, 1999: Comparison of different scoring systems for immunohistochemical staining. *J Clin Pathol*, 52(1), 75-77.
- Adaszek Ł, Gadomska D, Mazurek Ł, Łyp P, Madany J, Winiarczyk S, 2019: Properties of capsaicin and its utility in veterinary and human medicine. *Res Vet Sci*, 123, 14-19.
- Dickson C, Webster DR, Johnson H, Cecilia Millena A, Khan SA, 2002: Transforming growth factor-beta effects on morphology of immature rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, 195(1-2), 65-77.
- Erdost H, Özer A, Yakışık M, Özfiliz N, Zık B, 2006: FSH and LH cells in the laying hens and cocks, fed with a diet containing red hot pepper. *J Food Agr Env*, 4(1), 119-123.
- Erdost H, Ozfiliz N, Ozguden C, Gunes N, Onen S, İlhan T, Ozer A, 2007: Expression of a capsaicin receptor (VR1) in the testes of mice after an application of capsaicin. *Bull Vet Inst Pulawy*, 51(4), 649-653.
- Eurell AJ ve Frappier BL, 2006: Dellman's Textbook of Veterinary Histology. 6th ed., Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Haagmans BL, Hoogerbrugge JW, Themmen AP, Teerds KJ, 2003: Rat testicular germ cells and Sertoli cells release different types of bioactive transforming growth factor beta in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*, 5, 1-3.
- Holzer P, 1991: Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. *Adv Exp Med Biol*, 298(1), 3-16.
- İlhan T, Erdost H, 2013: Effects of capsaicin on testis ghrelin expression in mice. *Biotech Histochem*, 88(1), 8-10.
- İtman C, Mendis S, Barakat B, Loveland KL, 2006: Focus on TGF-β signaling. All in the family: TGF-β family action in testis development. *Reproduction*, 132(2), 233-246.
- İngman WV, Robertson SA, 2002: Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays*, 24(10), 904-914.
- Jung JC, Park GT, Kim KH, Woo JH, An JM, Kim KC, Chung HY, Bae YS, Park JW, Kang SS, Lee YS, 2004: Differential expression of transforming growth factor-beta in the interstitial tissue of testis during aging. *J Cell Biochem*, 92(1), 92-8.
- Lui WY, Lee WM, Cheng CY, 2003: TGF-betas: their role in testicular function and Sertoli cell tight junction dynamics. *Int J Androl*, 26(3), 147-60.
- Mızrak SC, Gadella BM, Erdost H, Ozer A, van Pelt AM, van Dissel-Emiliani FM, 2008: Spermatogonial stem cell sensitivity to capsaicin: an in vitro study. *Reprod Biol Endocrinol*, 6(52), 1-9.
- Mullaney BP, Skinner MK, 1993: Transforming growth factor-beta (beta 1, beta 2, and beta 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis. *Mol Endocrinol*, 7(1), 67-76.
- Oh TW, Oh TW, Ohta F, 2003: Dose-dependent effect of capsaicin on endurance capacity in rats. *Br J Nutr*, 90(3), 515-20.
- Özer A, Zık B, Erdost H, Özfiliz N, 2006: Histological investigations on the effects of feeding with a diet containing red hot pepper on the reproductive system organs of the cock. *Turk J Vet Anim Sci*, 30, 7-15.
- Özgüden-Akkoç CG, İlhan T, Peker S, Zık B, 2017: Düşük doz kapsaisin rat duodenumunda substans P ekspresyonu üzerine etkileri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 64(1), 31-36.
- Özgüden-Akkoç CG, Asmaz ED, İlhan T, Zık B, 2018: Düşük doz kapsaicin uygulanan siçanların ovaryumlarında TGF-Beta 1'in immunohistokimyasal yerleşimi. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 15(3), 238-246.

- Park SG, Yon JM, Lin C, Gwon LW, Lee JG, Baek IJ, Lee BJ, Yun YW, Nam SY, 2017: Capsaicin attenuates spermatogenic cell death induced by scrotal hyperthermia through its antioxidative and anti-apoptotic activities. *Andrologia*, 49(5), 1-8.
- Sharma SK, Vij AS, Sharma M, 2013: Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *Eur J Pharmacol*, 720(1-3), 55-62.
- Silva VEL, Cholewa JM, Jäger R, Zanchi NE, de Freitas MC, de Moura RC, Barros EML, Antunes BM, Caperuto EC, Ribeiro SLG, Lira FS, Pereira Dos Santos MA, Rossi FE, 2021: Chronic capsaicin supplementation increases fat-free mass and upper body strength but not the inflammatory response to resistance exercise in young untrained men: a randomized, placebo-controlled and double-blind study. *J Int Soc Sports Nutr*, 18(1), 50.
- Srinivasan K, 2016: Biological Activities of Red Pepper (*Capsicum annuum*) and Its Pungent Principle Capsaicin: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 56(9), 1488-1500.
- Toukan N, Kulnik ST, Lewko A, ElShaer A, 2022: Therapeutic applications of capsaicin in humans to target conditions of the respiratory system: A scoping review. *Respir Med*, 194(2022), 106772.
- Tütüncü Ş, Özfiliş N, 2011: Distribution of the vanilloid (capsaicin) receptor type 1 in the capsaicin treated rat ovaries on different sexual development periods. *Rev Med Vet*, 163(10), 460-467.
- Watrin F, Scotto L, Assoian RK, Wolgemuth DJ, 1991: Cell lineage specificity of expression of the murine transforming growth factor beta 3 and transforming growth factor beta 1 genes. *Cell Growth Differ*, 2(1), 77-83.



## Molecular Diagnosis of Bovine Genital Mycoplasmosis and Ureaplasma Infections by PCR

Başak OKSAY<sup>1,a,\*</sup>, Kadir Serdar DIKER<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of EU and Foreign Relations, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup>Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Aydın, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-2484-8001

<sup>b</sup>ORCID: 0000-0003-2150-5553

Received: 25.10.2022

Accepted: 05.04.2023

**How to cite this article:** Oksay B, Diker KS. (2023). Molecular Diagnosis of Bovine Genital Mycoplasmosis and Ureaplasma Infections by PCR. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 21-26, DOI:10.31196/huvfd.1194267.

**\*Correspondence:** Başak Oksay

Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of EU and Foreign Relations, Ankara, Turkey.

e-mail: basak.tolga@tarimorman.gov.tr

Available on-line at: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Abstract:** Genital Mycoplasmas (*Mycoplasma* spp. and *Ureaplasma diversum*), commensals of the genital tract, cause economic loss in cattle enterprises by mainly reproductive failure at the farm level. The productivity loss is due to genetic and environmental factors, stress, wrong antibiotic treatment, and immune system failure. This study aimed to determine the presence of bovine genital *mycoplasma* and *ureaplasmas* in healthy and suspected infertile cattle by PCR for the first time. Conventional methods are also used to examine test results. A comparison of results was conducted in both tested methods. For this aim, 356 bovine genital samples of healthy and suspected infertile cows and bulls of various herds were collected from Ankara and the provinces of Türkiye. Positivity in the genital sample of 221 healthy and 135 suspected infertile cattle was 61.2% by cultural methods and 67.7% by PCR, respectively. In comparison to culture, although PCR gave accurate results in a shorter time, findings show that proper results may be obtained when both methods are used together.

**Keywords:** Cattle, Mycoplasmosis, PCR, Ureaplasma.

### Sığırların Genital Mikoplazma ve Üreplazma İnfeksiyonlarının PCR ile Moleküler Teşhisi

**Özet:** Genital sistem kommensalleri olan genital mikoplazmalar (*Mycoplasma* spp. ve *Ureaplasma diversum*) büyükbaş hayvan işletmelerinde özellikle çiftlik düzeyinde üreme yetersizliği ile ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Verimlilik kaybının başlıca nedenleri genetik ve çevresel faktörler, stres, yanlış antibiyotik tedavisi ve bağışıklık sistemi yetmezliği ile ilişkilidir. Bu çalışmanın amacı, sağlıklı ve infertil olduğundan şüphelenilen sığırlarda sığır genital mikoplazma ve üreplazmaların varlığının ilk defa PCR ile belirlenmesidir. Test sonuçları ayrıca geleneksel yöntemlerle de incelenmiştir. Test edilen her iki yöntemde de sonuçların bir karşılaştırması yapılmıştır. Bu amaçla, Ankara ve Türkiye'nin illerinden çeşitli sürülere ait sağlıklı ve kısır olduğundan şüphelenilen inekler ve boğalardan toplam 356 adet sığır genital örneği toplandı. 221 sağlıklı ve 135 şüpheli infertil sığırın genital materyalinde pozitiflik sırasıyla kültürel yöntemlerle % 61,2 ve PCR ile % 67,7 olarak bulundu. Kültüre göre PCR daha kısa sürede doğru sonuçlar vermesine rağmen bulgular her iki yöntemin birlikte kullanılması durumunda uygun sonuçların alınabileceğini gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Büyükbaş hayvan, Mikoplazmosis, PCR, Üreplazma.

## Introduction

The *Mycoplasmataceae* family, includes *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and *Mycoplasma* genera and is generally associated with urogenital tract infections, reproductive failure, neonatal morbidity, and mortality. *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*), *Mycoplasma bovis genitalium* (*M. Bovigenitalium*), and *Ureaplasma diversum* (*U. diversum*) are bacteria that are pathogenic for the bovine genital tract without clinical signs (Razin et al., 1998). This situation causes economic losses by affecting meat and milk production in cattle enterprises. However, although the studies on these are limited, pathogenicity is still an issue under investigation.

*M. bovis* is the largest *Mycoplasma* species isolated from cattle. It causes mastitis, reproductive disorder, infertility, oophoritis, seminovesiculitis, synovitis, endometritis, salpingitis, salpingoperitonitis, seminal vesiculitis, and epididymitis as with many diseases in bovine animals. *M. bovis genitalium* also causes infertility, necrotic endometritis, epididymitis, seminal vesiculitis, and low spermatozoa motility, while among the *ureaplasmas*, mainly *U. diversum* causes reproductive disorders in cattle (Cassell et al., 1989). The transmission of these bacteria whose virulence is mainly dependent on the cellular immune response, is a factor that may adversely affect both domestic and international animal trade. Bovine mycoplasmas are detected in the laboratory using molecular, serological, and cultural techniques (Cardoso, 2000a). For rapid molecular identification of bovine mycoplasmas with restricted biosynthetic capabilities, polymerase chain reaction (PCR) is typically utilized to detect these agents by hybridization of randomly cloned DNA fragments and in vitro amplification of the 16S rRNA gene. Studies have shown that PCR is a sensitive method for detecting genital mycoplasmas in clinical samples (Abele-Horn et al., 1996).

In this study, the detection of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* spp. from genital clinical samples was carried out on healthy and infertile cattle in Ankara and other cities (Adana, Erzurum, Kars, Van, Diyarbakır, Erzincan) of Türkiye. At the same time, culture and molecular methods were compared to detect the agents from the clinical samples.

## Material and Methods

**Ethical approval:** This study is not subject to HADYEK permission by Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees".

### Bacterial isolates

**Standard Strains:** The Turkish Cattle Breeders' Central Association and the local cattle breeders in Ankara provided frozen healthy and suspected infertile semen samples. And, preputial washes of bulls with suspected infertility were obtained from Etlik Central Veterinary Control and Research Institute, Türkiye.

### Clinical samples

A total of 356 genital samples from cattle older than two years old, including 165 cows and 191 bulls, were detected for

reproductive failure. Bovine animals were deemed infertile despite at least three attempts at insemination. To detect genital mycoplasmosis, vulvar swabs from heavily discharged animals, cervical swabs from the elderly, and vaginal mucus from other cows without antibiotic treatment were collected. Also, the bulls' semen and preputial fluid were collected. Bulls that lacked clear clinical indicators were suspected of being infertile. Genital samples of infertile 76 cows and 59 bulls and healthy 89 cows and 132 bulls were analyzed. The genital samples of the cows were transferred to Amies transport medium and delivered to the laboratory in a cold chain within 24 hours. All samples were evaluated by cultural methods and PCR.

### Culture

*Mycoplasma* and *Ureaplasma* species from bovine genital samples are cultivated in the Eaton and *Ureaplasma* agar mediums. These specific mediums allow glucose fermentation, arginine hydrolysis, phosphatase activity, and tetrazolium reduction tests to identify *Mycoplasma* spp. As Davidson et al. (1994) suggested, both solid and liquid media were used for detection. The liquid media was dissolved in the Koch device, and the pH was adjusted to 6.0 and sterilized in an autoclave at 121°C for 15 minutes. Following the cooling of SLM (Standard Liquid Medium) to 56 °C, pH was adjusted to 6.8-7.0, which is the appropriate pH range for both *Ureaplasma* and *Mycoplasma* identification. Culture isolates were maintained by filtration through a sterile filter with a diameter of 0.2 µm (Schleicher & Schuell, BR0534-2) to enrich the composition of the media. Eaton and *Ureaplasma* agars were divided into petri plates at an average of 6 ml, and SLM agars were divided into tubes at 1.8 ml in sterile conditions. Cultured broths were stored at -20 °C for detection by PCR. Biochemical tests were conducted on colonies grown on standard liquid media with color changes and on Eaton and *Ureaplasma* agars. The isolated strains gave %100 negative results in glucose fermentation and arginine hydrolysis tests. However, digitonin sensitivity and urease tests were 100% positive in *U. diversum* cultures. Isolated *M. bovis* and *M. bovis genitalium* strains gave strong positive results, especially in the phosphatase tests. The main growth inhibition test results were considered in the differentiation of the two strains. Since *ureaplasmas* prefer microaerophilic conditions, a color change is usually observed at the bottom of SLM tubes. All positive and negative samples were stored at 20 °C to be detected by PCR.

### Molecular Identification

**Detection By PCR:** The study aimed to detect *Mycoplasma* and *Ureaplasma* strains using conventional methods and real-time PCR. Results were compared through the detection rate of the agent on SLM. Conventional methods examined 356 genital samples, and PCR identified a serial of SLM dilutions. For DNA extraction, SLM positive and negative aliquots of the genital swab and preputial washes were performed on direct FK (Phenol Chloroform). And semen was applied directly to cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide).

Positive and negative isolates were further examined by PCR amplifying the 16S rRNA gene using *Mycoplasma* and *Ureaplasma*- specific primers.

Positive control strains: *M. bovis* (NCTC 1031), *M. bovis genitalium* (NCTC 10122), *M. canadense* (NCTC 10152), *M. arginini* (NCTC 10129), and *M. dispar* (NCTC 10125) were obtained from Turkish Ministry of Agriculture and Forestry, Pendik Animal Diseases and Research Institute Mycoplasma Laboratory; and *U. diversum* (NCTC 11709) in lyophilized form from the Institute of Bacteriology, Faculty of Veterinary

Medicine, Vienna.

In detecting *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, and *U. diversum* by PCR, the standard strain DNA samples known to give positive results obtained from Maristela V. Cardoso (Instituto Biologico, Brazil) were used.

#### Primers Used in PCR

Primers were synthesized at 0.2 µmol synthesis scale in Biogen (Sao Paulo, Brazil) and obtained in the lyophilized form to be diluted to a concentration of 10 pmol, then vortexed and stored at -20 °C. Primers are presented in Table 1,2,3.

**Table 1.** Primers Used in the Diagnosis of Bovine Genital *Mycoplasma* and *Ureaplasma* by PCR.

Mikoplazma türü ile ilgili sekansı simgeleyen gen adı		Sekans Dizilimi	1. döngüde görüntülenen PCR ürünü (bp) Standart PCR	2. döngüde görüntülenen PCR ürünü (bp) Nested PCR
<i>Mycoplasma bovis</i> ( <i>uvrC</i> )	<i>uvrCF</i>	5'-TTA CGC AAG AGA ATG CTT CA-3'	1626	-
	<i>uvrCR</i>	5'-TAG GAA AGC ACC CTA TTG AT-3'		
<i>Mycoplasma bovis genitalium</i> ( <i>Mbg</i> )	<i>MbgF</i>	5'-CGT AGA TGC CGC ATG GCA TTT ACG G-3'	312	-
	<i>MbgR</i>	5'- CAT TCA ATA TAG TGG CAT TTC CTA C-3'		
<i>Ureaplasma diversum</i> ( <i>UD</i> )	NESTED PCR	<i>UD1F</i>	986	-
		<i>UD2R</i>		
		<i>UD3F</i>	-	215
		<i>UD4R</i>		
		5'-GCG GAG GTT AAC AAT ATG ACA GG-3'		

**DNA Extraction:** To detect the presence of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* by PCR in the genital samples of healthy and infertile cows and bulls with suspected infertility, inoculated standard broth and preputial

fluid samples were treated with FK according to the protocol determined by Csaikli et al. (1998) And, CTAB method was applied to fresh and frozen semen according to the protocol defined by Murray and Thompson (1980).

**Table 2.** Mixtures Used in PCR Protocols (Total Volume: 50 µl).

Mikoplazma türü ile ilgili sekansı simgeleyen gen adı		Sekans Dizilimi	1. döngüde görüntülenen PCR ürünü (bp) Standart PCR	2. döngüde görüntülenen PCR ürünü (bp) Nested PCR
<i>Mycoplasma bovis</i> ( <i>uvrC</i> )	<i>uvrCF</i>	5'-TTA CGC AAG AGA ATG CTT CA-3'	1626	-
	<i>uvrCR</i>	5'-TAG GAA AGC ACC CTA TTG AT-3'		
<i>Mycoplasma bovis genitalium</i> ( <i>Mbg</i> )	<i>MbgF</i>	5'-CGT AGA TGC CGC ATG GCA TTT ACG G-3'	312	-
	<i>MbgR</i>	5'- CAT TCA ATA TAG TGG CAT TTC CTA C-3'		
<i>Ureaplasma diversum</i> ( <i>UD</i> )	NESTED PCR	<i>UD1F</i>	986	-
		<i>UD2R</i>		
		<i>UD3F</i>	-	215
		<i>UD4R</i>		
		5'-GCG GAG GTT AAC AAT ATG ACA GG-3'		

Table 3. PCR Protocol.

Siklus	<i>M.bovis</i>		<i>M.bovigenitalium</i>		<i>U. diversum</i>			
	I. Döngü		I.Döngü		I.Döngü		II.Döngü	
Denaturasyon	95°C 15 dk		94 °C 9 dk		94°C 5dk		94°C 5dk	
Annealing (Bağlanma)	35 Döngü	95 °C 30 sn 53 °C 1,3 dk 72 °C 1,5 dk	37 Döngü	94 °C 30 sn 60 °C 1 dk 72 °C 1 dk	35 Döngü	94 °C 1 dk 55 °C 1 dk 72 °C 30 sn	35 Döngü	94 °C 1 dk 67 °C 1 dk 72 °C 20 sn
Elongasyon (Uzama)	72 °C 10 dk		72 °C 7 dk		72°C 10dk		72°C 10dk	

### Detection of Nucleic Acids

The electrophoresis device was operated at a constant current of 96 Volts for 1 hour and the PCR products amplified in the Thermal Cycler were run on a 1.5% agarose gel and examined by a UV transilluminator. DNA bands of the samples were evaluated by comparing the DNA marker with other bands of positive and negative controls.

Expected DNA amplifications in positive samples were 1626 bp for *M. bovis* (Subramaniam et al., 1998), 312 bp for *M. bovigenitalium* (Kobayashi et al., 1998), and 215 bp for *U. diversum* (Cardoso et al., 2000a; Cardoso et al., 2000b).

### Statistical analysis

The chi-square ( $\chi^2$ ) analysis method was used to interpret the data obtained in the study (Grunert & Valentine, 1998).

## Results

In the study, 356 genital samples of 165 cows and 191 bulls were examined by cultural and identification methods. The gender, health status, and sample type of the cattle included in the study were considered. Samples were collected from cattle over two years of age, declared to have infertility problems, and from healthy cattle for control purposes. Although inseminated at least three times, cows that did not show pregnancy were considered suspected infertile. A single sample was taken from each animal. Vulvar samples from cows with heavy discharge, cervical swab samples from the elderly, vaginal mucus samples from others, and semen and preputial fluid were collected from bulls. It was noted that antibiotics had not been given to these cattle recently. Of the cows, 76 were suspected of infertile, 89 of healthy; genital samples of 135 suspected were infertile and 221 healthy cattle, 59 of which were suspected infertile and 132 healthy, were examined.

### Culture

In the study, 56 (73.6%) of 76 infertility-suspected cows and 71 (79.7%) of 89 healthy cows were found to be positive

for *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. And bacteria were isolated in 48 (81.3%) of 59 suspected infertile bulls and 43 (32.5%) of 132 healthy bulls. 46 (70.7%) of 65 vaginal mucus, 18 (81.8%) of 22 cervical swabs and, 63 (80.7%) of 78 vulvar swabs were determined as positive. 44 (83%) of 53 preputial fluids belonging to infertile bulls, 42 (32.3%) of 130 frozen semen belonging to healthy bulls, 1 of 2 healthy and 4 of 6 fresh semen belonging to infertility- suspected bulls were found as positive for *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. The difference between positivity in the frozen semen and preputial fluid samples analyzed was significant ( $P > 0.05$ ).

### PCR Results

Standard PCR for *Mycoplasma* and nested PCR for *Ureaplasma* suspicious samples were applied, and DNA samples were extracted from cultures of these samples from healthy cattle with suspected infertility. In amplified PCR products, *M. bovis* bands were detected at 1626 bp and *M. bovigenitalium* at 312 bp, while bands of *U. diversum* were detected at 986 bp and 215 bp in nested PCR. All of the samples found positive for *Mycoplasma* and *Ureaplasma* by the cultural method gave positive results by PCR. No positivity was found in 115 (32.3%) of the examined samples of bovine genital *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. Each positivity was close to the other in both methods, and the difference between the groups was statistically insignificant ( $P > 0.05$ ). The positivity rate in PCR was 87.1% in healthy cows and 65.3% in infertility-suspected animals. The difference was found to be statistically insignificant ( $P > 0.05$ ). By PCR, positivity for *Mycoplasma* and *Ureaplasma* was determined in 241 (67.6%) of the DNA belonging to a total of 356 samples, 137 (83%) in cows and 104 (54.4%) in bulls. Based on the condition of the cow from which the genital sample was collected, 57 (75%) of 76 suspected infertility cows and 80 (89.8%) of 89 healthy cows were found to be positive for *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. According to the type of genital sample evaluated in the study, 51 (78.4%) of 65 vaginal mucus, 19 (86.3%) of 22 cervical swabs, 67 (85.8%) of 78 vulvar swabs were found positive by PCR while positivity in frozen semen from healthy bulls and preputial

fluid samples from bulls with suspected infertility were found to be 38.4% and 92.4%, respectively, in PCR. In the PCR results of fresh semen samples, the data for statistical analysis were insufficient. The difference between positivity in frozen semen and preputial fluid samples was insignificant ( $P > 0.05$ ).

## Discussion and Conclusion

*Mycoplasma* species, known to be mainly responsible for infertility in cattle, cause significant economic losses in cattle breeding worldwide, especially in Europe and North America. Various studies have been conducted in different parts of the world to determine the role of genital *Mycoplasma* species in urogenital tract infections in cattle. However, the role of *Mycoplasma* species in genital infections is still unclear. Stress, immune system failure, incorrect antibiotic treatment, animal transportation, and artificial insemination with infected semen are essential factors in increasing clinical cases (Vegi et al., 2021). Studies conducted in worldwide have proven that *Mycoplasma* strains can colonize the urogenital tract without causing any disease (Erno et al., 1967; Lein, 1986). The unique phenotypic variability and antigenic variation seen in many *Mycoplasma* species make it difficult for them to be recognized by the host immune system. And the agent becomes resistant to treatments with antibiotics such as tetracycline, tilmicosin, and spectinomycin.

In Türkiye, this infection is thought to cause significant economic losses in cattle breeding as in other countries. Studies on *Mycoplasma* species in Türkiye are generally on detecting CCPP for many years. In this regard, there has been no comprehensive research conducted in our country for the identification and Detection of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* causing genital infections in cattle by PCR yet. Today, PCR, one of the molecular methods that give accurate results quickly, is used instead of serological methods with a high probability of false positive results with time-consuming routine biochemical tests. Many studies have reported that PCR is more sensitive than other methods (Razin, 2002).

In this study, the method specified by Genovez et al. (1989) was used in the detection by the cultural method and in the examination of the collected samples. Accordingly, solid media was incubated for 15 days at 37 °C in a microaerophilic jar, and liquid media were incubated at 37 °C for five days in an aerobic environment. Accordingly, this information was considered in detecting the agent by PCR. In the evaluation based on the origin of the examined sample, positivity by the conventional method was determined as 70.7% in vaginal mucus samples, 80.7% in vulvar swabs, and 81.8% in cervical swabs. In PCR, these results were determined as 78.4 %, 86.3 %, 85.8 %, respectively. Based on the comparison of the number of samples collected from cows, the positivity obtained by both methods was the highest in cervical and vulvar swab samples and less frequently in vaginal mucus samples. However, the difference between the groups was insignificant according to the chi-square analysis method ( $P > 0.05$ ). In addition, when

the evaluation was made according to the health status of the cows from which the samples were obtained, the positivity of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* detected by conventional methods and PCR in the cervical swab of healthy cows was found to be 12.8% higher than in the cows with suspected infertility. However, the difference was considered statistically insignificant according to the number of samples examined ( $P > 0.05$ ). On the other hand, the difference between *Mycoplasma* and *Ureaplasma* positivity rates detected in healthy and infertile cows in the genital samples of cows examined by both methods was also found to be statistically insignificant ( $P > 0.05$ ). In addition, 96 (44%) *Mycoplasma* and 122 (55.9%) *Ureaplasma* were isolated from healthy cows and bulls with suspected infertility by cultural methods. A total of 56 *Mycoplasma* was isolated from 29 (38.1%) infertility- suspected cows and 27 of healthy cows. 71 *Ureaplasmas* were detected, including 27 (35.5%) cows with suspected infertility and 44 (49.4%) healthy cows. Accordingly, it was observed that *Mycoplasma* growth in cows was higher in infertility suspects and *ureaplasma* growth in healthy cows. However, the difference was considered statistically insignificant ( $P > 0.05$ ).

In another study, Cardoso et al. (2000a) examined infected bovine semen. The presence of *Mycoplasma* spp. and *U. diversum* in semen were found to be 1.02% and 1.32% higher, respectively. In another study conducted by Gregory et al. (2012) in sheep, the rate of *mycoplasma*-infected semen resulted in higher results than that of Cardoso et al. (2000a).

According to the data obtained in the study, the findings related to the health status of the cows and the type of sample examined were partially compatible. High positivity in healthy animals suggests that the animals may be under stress or in the initial stage of infection. A definite conclusion could not be reached with the results obtained on the role of *Mycoplasma* strains in infertility. The reason for this was thought to be important for the pathogenicity differences between *Mycoplasma* strains. Although the difference between conventional methods and PCR results was found to be statistically insignificant in the study, it was determined that PCR gave more accurate results in a shorter time than conventional methods in the early detection of *Mycoplasma* strains in reproductive disorders in cattle. The high rate of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* positivity detected in the tested samples of healthy and infertile cattle was associated with the fact that these microorganisms are also normal flora agents in the genital tract. However, it is thought that the risk of contamination is high during sample collection in the genital tract of cows, and this may affect the results of detection. In addition, this study highlighted the importance of further research on the pathogenicity of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*.

## Ethical Approval

This study is not subject to Hadyek's permission within the scope of "the regulation on the working principles and procedures of animal experiments ethics committees"

published in the official newspaper dated February 15, 2014 and numbered 28914. The authors declared that they comply with the Research and Publication Ethics.

### Conflict of Interest

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

### Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 9% as stated in the report uploaded to the system.

### Acknowledgment

We would like to thank Veterinarian Microbiologist Dr. Maristela Cardosa from Instituto Biologica and Veterinary Microbiologist Dr. Ümit Özdemir from Istanbul Pendik Veterinary Control Institute for their support in this study.

### Explanation

(International Mycoplasma Congress- Cambridge-London) It was presented as a summary paper at the International Microbiology Congress (2006). (Extracted from the author's doctoral thesis of the same name).

### Author Contributions

Motivation / Concept: KSD

Design: BO, KSD

Control/Supervision: KSD

Data Collection and / or Processing: BO

Analysis and / or Interpretation: BO, KSD

Literature Review: BO

Writing the Article: BO

Critical Review: KSD

### References

Abele-Horn M, Blending C, Becher C, Emmerling P, Ruckdeschel G. 1996: Evaluation of commercial kits for quantitative identification and tests on antibiotic susceptibility of genital mycoplasmas. *Zentralbl Bakteriol*, 284 (4), 540-549.

Cardoso MV, Blanchard A, Ferris S, Timenetsky VR, Cunha RA, 2000a: Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a

newly developed PCR-based detection assay. *Vet Microbiol*, 72, 241-250.

Cardoso MV, Scarcelli E, Grasso LM, Teixeira SR, Genovez ME, 2000b: *Ureaplasma diversum* and reproductive disorder in Brazilian cows and heifers; first report. *Anim Reprod Sci*, 63, 137-143.

Cassell GH, Crouse DT, Waites KB, Rudd PT, Davis JK, 1989: Does *Ureaplasma urealyticum* cause respiratory disease in newborns? *Pediat Infect Dis*, 7, 535-541.

Csaikli UM, Bastian H, Brettschneider R, Gauch S, Meir A, Schauer M, Scholz F, Sperisen C, Vornam B, Ziegenhagen B, 1998: Comparative analysis of different DNA extractions protocols: A fast, universal maxi-preparation of high-quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. *Plant Mol Bio Rep*, 16, 69-86.

Davidson MK, Brown M, Schoeb TR, Cassell GH, Lindsey JR, 1982: Natural infection of *Mycoplasma arthritidis* in mice. *Rev Infect Dis*, 4, 243-244.

Erno H, Plastring WN, Toutellotte ME, 1967: *Mycoplasma* isolation from prepuce and semen of bulls. *Acta Vet Scand*, 8, 123-135.

Genovez ME, Scarcelli E, Rojas S, 1989: Campilobacteriose genital: proposta de diagnostico mais sensivel em touros, *Sao Paulo Arq Inst Biolo*, 56, 5-7.

Gregory L, Rizzo H, Gaeta NC, Tortorelli G, Cardoso MV, Mettifo E, Buzinhani M, Timenetsky J. 2012: Interference of *Mycoplasma* spp. or *Ureaplasma* spp. in ovine semen quality. *J Microbiol Res*, 2 (5), 118-122.

Gruenert S, Valentine JW, 1998: The school culture survey. Columbia, MO: University of Missouri, Columbia.

Kobayashi H, Hirose K, Worarach A, Paugtes P, Ito N, Morozumi T, Yamamoto K, 1998: In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovigenitalium* by PCR. *J Vet Med Sci*, 60, 1299-1303.

Lein DH, 1986. The current role of *Ureaplasma*, *Mycoplasma*, *Haemophilus somnus* in bovine reproductive disorders: Proceedings of the Eleventh Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. 11, 27-32.

Murray MG, Thompson WF, 1980: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 8, 4321.

Razin S, Yogev D, Naot Y, 1998: Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62 (4), 1094-1156.

Razin S, 2002: Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. 24,538, Kluwer Academic Publishers, New York.

Subramaniam S, Bergonier D, Poumarat F, Capaul S, Schlatter Y, Nicolet J, Frey J, 1998: Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the uvrC genes by PCR. *Mol Cell Prob*, 12, 161- 169.

Vegi B, Biro E, Grozner D, Kreizinger Z, Gyuranecz M, 2021: *Mycoplasma* species in the male reproductive organs and the fresh and frozen semen of the Hungarian native goose. *Avi Path*, 50:6.





## Investigation of the Effects of Jerusalem Thorn (*Paliurus spina-christi* Mill.), Oriental Hackberry (*Celtis tournefortii* L.) Fruits and Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Seed on Microbial Quality and Physicochemical Properties of Meatballs

Mehmet Emin AYDEMİR<sup>1,a,\*</sup>, Ali ARSLAN<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>2</sup>Firat University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Elazığ, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-5849-1741

<sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-3011-5592

Received: 22.12.2022

Accepted: 13.04.2023

**How to cite this article:** Aydemir ME, Arslan A. (2023). Investigation of the Effects of Jerusalem Thorn (*Paliurus spina-christi* Mill.), Oriental Hackberry (*Celtis tournefortii* L.) Fruits and Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Seed on Microbial Quality and Physicochemical Properties of Meatballs. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 27-34, DOI:10.31196/huvfd.1222759.

**\*Correspondence:** Mehmet Emin AYDEMİR  
Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Şanlıurfa, Türkiye.  
e-mail: aydemiremin23@harran.edu.tr

Available on-line at:

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Abstract:** This study was conducted to examine the effect of Jerusalem thorn (*Paliurus spina-christi* Mill./PSC) and oriental hackberry (*Celtis tournefortii* L./CT) fruits and black cumin (*Nigella sativa* L./NS) seed on the microbial quality and physicochemical properties during the storage of meatballs +4 °C. For this purpose, PSC, CT fruits, and NS seeds were added to the meatballs at 2% to form four groups, including the control. Prepared meatball samples were covered with stretch film in polyethylene plates and stored at 4±1 °C for 16 days. Analyzes were made on the 0, 4, 8, 12, and 16th days of storage in the meatball samples. The pH values of the meatball samples were determined between 5.89-6.02 on day 0 and between 6.10-6.49 on day 16,  $a_w$  values between 0.956-0.964 on day 0 and 0.971-0.980 on day 16. Total mesophilic aerobic bacteria (TMAB), total psychrotrophic bacteria (TPAB), lactic acid bacteria (LAB), and yeast-mold counts of meatball samples were 5.14-5.53, 4.62-4.83, 5.04-5.32 and 3.40-3.87 log<sub>10</sub> cfu/g, respectively on day 0, and 7.01-7.9, 7.64-8.24, 7.59-8.05 and 5.69-6.27 log<sub>10</sub> cfu/g, respectively on day 16. It was determined that PSC and CT fruits and NS seed slowed down the microbial growth rate in the meatballs from the eighth day. The best antimicrobial effect was found in psychrotrophic bacteria for CT fruit, LAB and yeast-mold for NS seed. As a result, it can be recommended to add PSC, CT fruits, and NS seeds to their composition to extend the shelf life of meatballs up to one week. The results of this study can provide helpful information for anyone dealing with food and further studies investigating the shelf life of meat and meat products.

**Keywords:** *Celtis tournefortii* L., Meatball, Microbiological quality, *Nigella sativa* L., *Paliurus spina-christi* Mill.

### Karaçalı (*Paliurus spina-christi* Mill.), Dardağan (*Celtis tournefortii* L.) Meyvelerinin ve Çörek Otu (*Nigella sativa* L.) Tohumunun Köftelerin Mikrobiyal Kalitesi ve Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması

**Özet:** Bu çalışmanın amacı karaçalı (*Paliurus spina-christi* Mill./PSC), dardağan (*Celtis tournefortii* L./CT) meyveleri ve çörek otu (*Nigella sativa* L./NS) tohumunun, köftelerin +4 °C'deki muhafazasında mikrobiyal kalite ve fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır. Bu amaçla PSC, CT meyveleri ve NS tohumu köftelere %2 oranında ilave edilerek kontrol dahil dört grup oluşturuldu. Hazırlanan köfte örnekleri polietilen tabaklar içinde streç film ile kaplanarak 4±1 °C'de 16 gün muhafaza edildi. Köfte örneklerinde muhafazanın 0, 4, 8, 12 ve 16. günlerinde analizler yapıldı. Köfte örneklerinin pH değerleri 0. günde 5,89-6,02, 16. gününde ise 6,10-6,49 arasında,  $a_w$  değerleri 0. günde 0,956-0,964, 16. gününde ise 0,971-0,980 arasında tespit edildi. Total mezofil aerob bakteri (TMAB), total psikrotrof bakteri (TPAB), Laktik asit bakterileri (LAB) ve maya-küf sayıları 0. gün sırasıyla, 5,14-5,53, 4,62-4,83, 5,04-5,32 ve 3,40-3,87 log<sub>10</sub> kob/g arasında 16. günde ise sırasıyla 7,01-7,9, 7,64-8,24, 7,59-8,05 ve 5,69-6,27 log<sub>10</sub> kob/g arasında saptandı. PSC, CT meyvesi ve NS tohumunun köftelerde sekizinci günden itibaren mikrobiyal üreme hızını yavaşlattığı saptandı. Özellikle CT meyvesinin psikrotrof bakteriler üzerinde, NS tohumunun ise LAB ve maya-küf üzerinde en iyi antimikrobiyal etki sağladığı saptandı. Sonuç olarak köftelerin raf ömrünü bir haftaya kadar uzatmak için bileşimlerine PSC, CT meyvelerinin ve NS tohumu eklenmesi önerilebilir. Bu çalışmanın sonuçları et ve et ürünlerinin raf ömürlerini araştıran ileri çalışmalar ve gıda ile uğraşan herkes için yararlı bilgiler sağlayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Celtis tournefortii* L., Köfte, Mikrobiyolojik kalite, *Nigella sativa* L., *Paliurus spina-christi* Mill.

## Introduction

Meatball is generally cooked and consumed after beef or mutton is ground into minced meat, added fat (tallow fat, tail fat) and various spices, and brought to the desired shape and size (Halid and Rahim, 2019). Meatballs and their varieties are meat products widely preferred and consumed in fast food. Microbial contamination may occur if the necessary hygienic rules and/or cold chain are not observed during the production, processing, packaging, storage, distribution, and preservation of meat products such as meatballs. As a result of the proliferation of saprophytic microorganisms, spoilage may occur in meat products, the shelf life of the products is shortened, and in the presence of pathogenic factors, food-borne infections, and toxications may occur (Mansur et al., 2019).

Meat spoilage occurs due to microbiological and chemical, enzymatic reactions (Mansur et al., 2019). Because of the chemical composition of meat, which provides a suitable environment for microorganisms, and the nutrients it contains, microbiological spoilage generally occurs more quickly. Microbial spoilage is caused by microbial growth and consumption of meat nutrients by bacteria, which release undesirable metabolites (Casaburi et al., 2015). Meat and meat products are evaluated in terms of microbial quality (total aerobic bacteria, psychrotrophic bacteria, enterobacteria, fecal coliforms, *Salmonella* spp., *Listeria monocytognes*, *Escherichia coli*, enterococci, molds, etc.) to determine whether they are suitable for consumption and their shelf life (Mansur et al., 2019). Moreover, pH and water activity ( $a_w$ ) values are essential criteria affecting the growth of microorganisms; they are important in determining the microbial quality of meat and meat products (Leistner, 2000).

It is crucial to prevent microbial proliferation in maintaining the quality of meat products during storage. The microbial load of the meat should be low initially, and microbial growth should be minimized or inhibited as much as possible during storage. In recent years, as consumers prefer more organic or minimally processed foods and foods containing fewer synthetic chemical additives, natural herbal preservatives rich in phenolic compounds are used as an alternative to artificial chemical preservatives to prevent a microbial increase in meat and meat products (Prommachart et al., 2020).

PSC is a shrub plant in the Rhamnaceae family. In Turkey, it can be grown all around Anatolia. In studies on ripe fruits and leaves of PSC, it has been reported that they are rich in polyphenolic substances and have antioxidant and antimicrobial effects (Şen et al., 2018; Takım and Işık 2020; Takım, 2021; Zor et al., 2017). *Celtis*, belonging to the Cannabaceae family, is a medium-sized tree species that grows in temperate, tropical, and subtropical regions and sheds its leaves yearly. CT plant is one of the *Celtis* species that grows naturally in Türkiye. Studies on ripe fruits and leaves of CT have reported that these parts of the plant are rich in polyphenolic substances, have high tocopherol content, and have antioxidant and antimicrobial effects (Gecibesler, 2019; Keser et al., 2017; Yıldırım et al., 2017). NS plant is a spice of the Ranunculaceae family that has been

used for culinary and medicinal purposes for years. NS is grown in many parts of the world (Singh et al., 2014). Studies have shown that NS seed has a strong antioxidant and antimicrobial effect on food (Chauhan et al., 2018; Mahros et al., 2021; Zwolan et al., 2020). However, it has not been reported that PSC and CT fruits have not been added to foods before and how they affect the microbial and physicochemical properties of foods. Therefore, PSC and CT fruits were preferred in the study.

This study was conducted to investigate the effect of Jerusalem thorn (*Paliurus spina-christi* Mill./PSC) and oriental hackberry (*Celtis tournefortii* L./CT) fruits and black cumin (*Nigella sativa* L./NS) seed on the microbial quality and physicochemical properties during the storage of meatballs +4 °C.

## Materials and Methods

**Ethics Committee:** Since meatball samples produced in the laboratory were used as material in the study, ethics committee permission is not required.

**Preparation of meatball dough:** For ground meat, *Musculus semitendinosus* and *M. Semimembranosus* muscles of bullock were used, and ram tail fat was used for tail fat. Meat and fats were obtained from a local butcher in Elazığ, brought to the laboratory under cold chain conditions and stored in refrigerators. Meatballs were prepared using the meatball composition in Table 1. PSC and CT fruits and NS seeds, ground into flour, were added to the meatball mixture at a rate of 2% each. After all the meatball mixture's ingredients were mixed, they were kept at +4 °C for 3 hours. Then, the meatball dough was mixed homogeneously again and put into a steel mold with a diameter of 5 cm and a height of 1 cm; each meatball was 25±1 g. Then, each group was covered with stretch film in polyethylene plates and stored at 4±1 °C for 16 days. Analyzes were performed on days 0 (before packaging), 4, 8, 12, and 16 days of storage. In the microbiological analysis of the meatballs, total mesophilic aerobic bacteria (TMAB), total psychrotrophic bacteria (TPAB), lactic acid bacteria (LAB), yeast, and mold counts were made. In addition, pH and water activity ( $a_w$ ) determinations were made in these groups. All analyzes were performed in pairs in parallel and in triplicate independently. Dry matter, ash, protein, and fat were analyzed after preparing the meatball dough for each replicate.

**Preparation of samples for microbiological analysis:** Meatball samples 25 g were weighed under aseptic conditions and put into sterile sample bags (stomacher 400, Italy). 225 mL of 0.1% peptone water (Merck, Darmstadt, Germany) was added and homogenized in a stomacher (ISOLAB, Germany), and a  $10^{-1}$  dilution was prepared. Other dilutions of the sample up to  $10^{-7}$  were prepared from this dilution, provided that the same diluent was used. Sowing was done in double series by using the cast plate method for counting other microorganisms except for yeast and mold counting. The smear plate method was used for yeast mold enumeration. Plates containing 30–300 colonies were

evaluated after incubation (USDA/FSIS, 2011). Counts were made with an automatic colony counter (Acolyte Colony Counter-7500 SYN Synbiosis).

**Total mesophilic aerobic bacteria (TMAB) count:** Plate Count Agar (PCA, Merck, Darmstadt, Germany) medium was inoculated for counting and incubated at 35 °C for 48 hours. Colony counts were made after incubation (USDA/FSIS, 2011).

**Psychrotrophic bacteria count:** Petri dishes were incubated at 7±1 °C for ten days by inoculating on PCA medium for counting. An incubation count was done (USDA/FSIS, 2011).

**Lactic acid bacteria count:** To determine the number of LAB, the plates were incubated at 30±1 °C for three days by sowing on Man-Rogasa Sharpe (MRS) Agar medium. Colony counts were made after incubation (ISO, 1998).

**Yeast and mold count:** For enumeration, the plates were incubated at 25±1 °C for five days by inoculating on Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar medium (Lab/LAB 217, Lancashire/United Kingdom). Yeast and mold counts were made after incubation (ISO, 2008).

**Chemical Analysis:** For chemical analysis, pH values, digital pH meters (EDT. GP 353) and water activity ( $a_w$ ) values of meatball samples were determined with a water activity device (Aqualab, Meter Group, Inc., Pullman,

WA, USA) (AOAC, 1990; Lang and Steinberg, 1980). Dry matter and ash content of meatball samples was determined by the gravimetric method (AOAC, 2002a; AOAC, 2002b), the total fat amount was determined by the Soxhlet extraction method (AOAC, 2000), and protein amount was determined by Kjeldahl method (AOAC, 1998).

**Statistical analysis:** For the statistical analysis of the study data, the SPSS package program (24.0 for Windows software SPSS Inc., NY, USA) was analyzed by one-way analysis of variance at a 95% confidence interval. Duncan's multiple comparison tests were used to determine the difference between the means of the experimental groups after analysis of variance (SPSS, 2017).

## Results

The chemical composition of the meatball samples is given in Table 2. The pH values determined in the meatball samples during storage are shown in Figure 1, and the  $a_w$  values are shown in Figure 2. The total number of mesophilic aerobic bacteria detected in the meatball samples during storage is given in Table 3, the number of psychrotrophic bacteria in Table 4, the number of yeast-moulds in Table 5, and the number of lactic acid bacteria in Table 6.

**Table 1.** Composition of meatball groups (%).

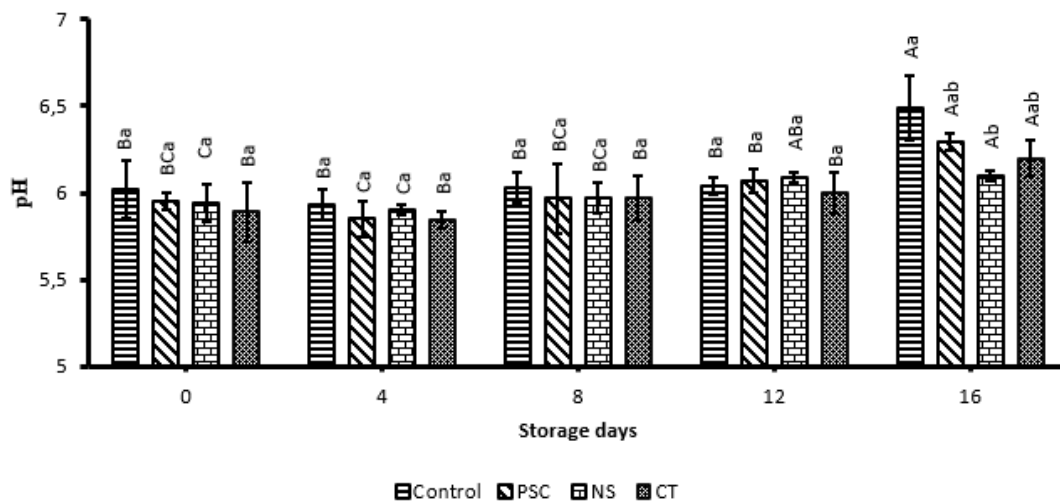
Product	Groups	
	Control group(%)	Meatballs with PSC/CT/NS added(%)
Lean ground beef	74	72
Tail fat	20	20
Salt	2	2
Garlic	1,3	1,3
Onion	1,7	1,7
Red pepper	0,35	0,35
Black pepper	0,35	0,35
Ginger	0,15	0,15
Cumin	0,15	0,15
PSC/CT/NS	-	2

PSC: *Paliurus spina-christi* Mill. fruit NS: *Nigella sativa* L. seed, CT: *Celtis tournefortii* L. Fruit.

**Table 2.** The composition of the meatballs (%).

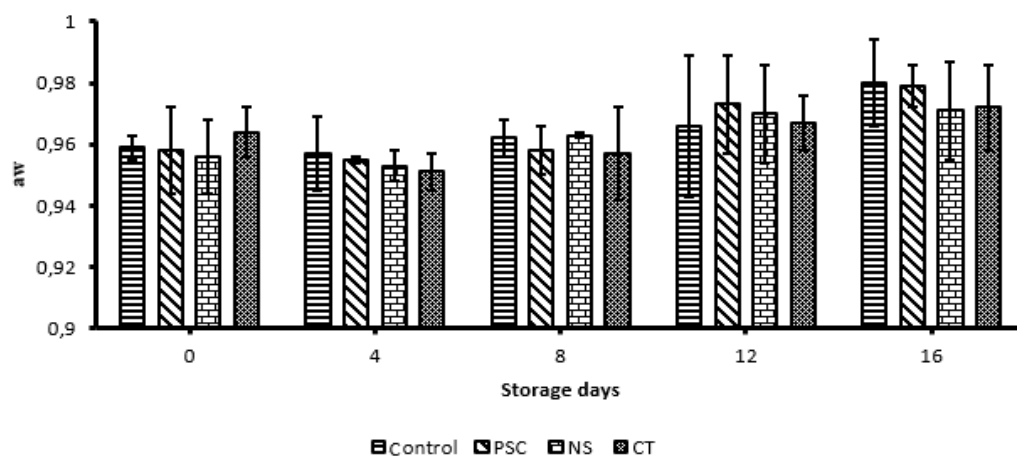
Group	KM	Ash	Protein	Fat
Control	46.16±0.58	2.76±0.26	19.25±0.58	21.03±0.71
PSC	47.12±0.64	2.68±0.74	17.82±0.84	20.30±0.52
NS	46.57±0.72	2.58±0.32	18.22±0.28	20.71±0.82
CT	47.38±1.06	2.81±0.35	18.73±0.44	20.56±1.01

KM: Dry matter PSC: *Paliurus spina-christi* Mill. fruit, NS: *Nigella sativa* L. seed, CT: *Celtis tournefortii* L. Fruit.



**Figure 1.** Changes in pH value in meatballs during storage (mean±standard deviation).

PSC: Paliurus spina-christi Mill. fruit, NS: Nigella sativa L. seed, CT: Celtis tournefortii L. Fruit, **A-D**: The mean values with different letters between the storage days are statistically different (P<0.05), **a-b**: The mean values with different letters between the groups are statistically different (P<0.05).



**Figure 2.** Changes in aw value in meatballs during storage (mean±standard deviation).

PSC: Paliurus spina-christi Mill. fruit, NS: Nigella sativa L. seed, CT: Celtis tournefortii L. fruit.

**Table 3.** Total number of mesophilic aerobic bacteria (TMAB) detected in meatballs (log<sub>10</sub> cfu/g±standard deviation).

Group	Storage time (Days)				
	0	4	8	12	16
Control	5.53±0.37 <sup>Ea</sup>	6.10±0.23 <sup>Da</sup>	6.81±0.17 <sup>Ca</sup>	7.45±0.04 <sup>Ba</sup>	7.91±0.25 <sup>Aa</sup>
PSC	5.14±0.14 <sup>Ea</sup>	5.98±0.36 <sup>Da</sup>	6.55±0.12 <sup>Cab</sup>	6.85±0.13 <sup>ABb</sup>	7.09±0.09 <sup>Ab</sup>
NS	5.35±0.19 <sup>Ea</sup>	5.87±0.39 <sup>Da</sup>	6.39±0.19 <sup>Cb</sup>	6.73±0.19 <sup>ABb</sup>	7.01±0.08 <sup>Ab</sup>
CT	5.29±0.17 <sup>Ca</sup>	6.02±0.33 <sup>Ba</sup>	6.36±0.26 <sup>Bb</sup>	6.55±0.50 <sup>Bb</sup>	7.37±0.08 <sup>Aa</sup>
Meat	5.55±0.45 <sup>a</sup>	-	-	-	-

PSC: Paliurus spina-christi Mill. fruit, NS: Nigella sativa L. seed, CT: Celtis tournefortii L. Fruit, **A-C**: Values with different superscripts in the same row are statistically different (P<0.05). **a-b**: Values with different superscripts in the same column are statistically different (P<0.05).

**Table 4.** The number of psychrotrophic bacteria detected in meatballs ( $\log_{10}$  cfu/g $\pm$ standard deviation).

Group	Storage time (Days)				
	0	4	8	12	16
Control	4.75 $\pm$ 0.09 <sup>Da</sup>	6.38 $\pm$ 0.32 <sup>Ca</sup>	7.15 $\pm$ 0.38 <sup>Ba</sup>	7.55 $\pm$ 0.17 <sup>Ba</sup>	8.24 $\pm$ 0.45 <sup>Aa</sup>
PSC	4.62 $\pm$ 0.25 <sup>Ea</sup>	6.15 $\pm$ 0.09 <sup>Dab</sup>	6.45 $\pm$ 0.21 <sup>Cb</sup>	7.21 $\pm$ 0.07 <sup>Bb</sup>	7.64 $\pm$ 0.02 <sup>Ab</sup>
NS	4.83 $\pm$ 0.06 <sup>Da</sup>	6.32 $\pm$ 0.27 <sup>Cb</sup>	6.49 $\pm$ 0.12 <sup>Cb</sup>	7.27 $\pm$ 0.08 <sup>Bb</sup>	7.66 $\pm$ 0.04 <sup>Ab</sup>
CT	4.73 $\pm$ 0.21 <sup>Da</sup>	5.77 $\pm$ 0.16 <sup>Db</sup>	6.19 $\pm$ 0.09 <sup>Cb</sup>	7.29 $\pm$ 0.04 <sup>Bb</sup>	7.63 $\pm$ 0.07 <sup>Ab</sup>
Meat	4.74 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	-	-	-	-

PSC: *Paliurus spina-christi* Mill. fruit, NS: *Nigella sativa* L. seed, CT: *Celtis tournefortii* L. Fruit, A-E: Values with different superscripts in the same row are statistically different ( $P<0.05$ ). a-b: Values with different superscripts in the same column are statistically different ( $P<0.05$ ).

**Table 5.** Yeast-mold number detected in meatballs ( $\log_{10}$  cfu/g $\pm$ standard deviation).

Group	Storage time (Days)				
	0	4	8	12	16
Control	3.87 $\pm$ 0.47 <sup>Ca</sup>	4.14 $\pm$ 0.06 <sup>Ca</sup>	4.36 $\pm$ 0.30 <sup>Ca</sup>	4.98 $\pm$ 0.09 <sup>Ba</sup>	6.27 $\pm$ 0.40 <sup>Aa</sup>
PSC	3.78 $\pm$ 0.20 <sup>Ba</sup>	4.14 $\pm$ 0.15 <sup>Ba</sup>	4.16 $\pm$ 0.28 <sup>Ba</sup>	4.37 $\pm$ 0.12 <sup>Bb</sup>	5.71 $\pm$ 0.55 <sup>Aa</sup>
NS	3.40 $\pm$ 0.36 <sup>Cb</sup>	3.12 $\pm$ 0.45 <sup>Cb</sup>	3.95 $\pm$ 0.10 <sup>BCa</sup>	4.23 $\pm$ 0.25 <sup>Bb</sup>	5.69 $\pm$ 0.36 <sup>Aa</sup>
CT	3.62 $\pm$ 0.31 <sup>Ca</sup>	3.58 $\pm$ 0.43 <sup>Cab</sup>	4.12 $\pm$ 0.24 <sup>BCa</sup>	4.57 $\pm$ 0.26 <sup>Bab</sup>	5.88 $\pm$ 0.15 <sup>Aa</sup>
Meat	2.48 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	-	-	-	-

PSC: *Paliurus spina-christi* Mill. fruit, NS: *Nigella sativa* L. seed, CT: *Celtis tournefortii* L. Fruit, A-C: Values with different superscripts in the same row are statistically different ( $P<0.05$ ). a-b: Values with different superscripts in the same column are statistically different ( $P<0.05$ ).

**Table 6.** Number of lactic acid bacteria detected in meatballs ( $\log_{10}$  cfu/g $\pm$ standard deviation).

Group	Storage time (Days)				
	0	4	8	12	16
Control	5.32 $\pm$ 0.27 <sup>Da</sup>	6.59 $\pm$ 0.16 <sup>Ca</sup>	7.07 $\pm$ 0.29 <sup>Ba</sup>	7.62 $\pm$ 0.38 <sup>Aa</sup>	8.05 $\pm$ 0.07 <sup>Aa</sup>
PSC	5.10 $\pm$ 0.23 <sup>Da</sup>	5.96 $\pm$ 0.14 <sup>Ca</sup>	6.54 $\pm$ 0.32 <sup>Ba</sup>	7.42 $\pm$ 0.28 <sup>Aa</sup>	7.63 $\pm$ 0.18 <sup>Ab</sup>
NS	5.04 $\pm$ 0.41 <sup>Ca</sup>	5.28 $\pm$ 0.19 <sup>Cc</sup>	5.89 $\pm$ 0.11 <sup>Bb</sup>	7.06 $\pm$ 0.40 <sup>Aa</sup>	7.59 $\pm$ 0.30 <sup>Ab</sup>
CT	5.28 $\pm$ 0.30 <sup>Da</sup>	5.74 $\pm$ 0.23 <sup>Cb</sup>	6.76 $\pm$ 0.35 <sup>Ba</sup>	7.29 $\pm$ 0.10 <sup>Aa</sup>	7.62 $\pm$ 0.21 <sup>Ab</sup>
Meat	5.42 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	-	-	-	-

PSC: *Paliurus spina-christi* Mill. fruit, NS: *Nigella sativa* L. seed, CT: *Celtis tournefortii* L. Fruit, A-D: Values with different superscripts in the same row are statistically different ( $P<0.05$ ). a-c: Values with different superscripts in the same column are statistically different ( $P<0.05$ ).

## Discussion

The pH values of meatball samples were determined between 5.89-6.02 on the 0th day and between 6.10-6.49 on the 16 days. It was determined that there was a decrease in pH values on 4th day in all groups during storage. The decrease in pH on the 4th day is likely due to the low pH value of the components used in the meatball dough. After the 4th day, a continuous increase in pH values was observed. This increase is thought to be due to the high buffering capacity of proteins and the proteolytic effects of microorganisms (Çağlar et al., 2018; İncili et al., 2021). The lowest pH value on the 16th day was detected in the CT and NS groups. The low pH value in these groups is thought to be due to less microbial growth due to the phenolic compounds they contain (Can and Şahin, 2019; Çağlar et al., 2018).

The  $a_w$  values of the meatball samples were 0.956-0.964 on day 0 and between 0.971-0.980 on day 16 of storage. It was determined that there was a decrease in  $a_w$  values on the 4th day in all groups during storage. The decrease in water activity on the 4th day is thought to be due to the salt and other ingredients added to the meatballs. It has been reported that salt reduces  $a_w$  in foods (Yıldırım, 2018). The effects of different plants and extracts used in meatball production on the  $a_w$  value have been studied by many researchers, and it has been reported that there are fluctuations in  $a_w$  values during storage and that there is no stable  $a_w$  value (Kahraman, 2021).

TMAB count in meatball samples was determined to be 5.14-5.53  $\log_{10}$  cfu/g on day 0 and 7.01-7.91  $\log_{10}$  cfu/g on day 16 of storage. TMAB was detected above the reported number on the 12th day of storage in the control group

meatballs and the 16th day in the PSC, CT, and NS groups. Therefore, it was determined that the plants used effectively affected the number of TMAB in meatballs. Although there was no difference between the other groups and control in the first days of storage, there was a significant difference on the 8, 12, and 16th storage days ( $P<0.05$ ). It has been reported that the effect of the plants on the TMAB numbers is due to the phenolic compounds they contain because phenolic compounds have antimicrobial effects (Nikmaram et al., 2018). The lowest TMAB count was observed in the NS group (7.01 log<sub>10</sub>) on day 16 of storage. Many researchers have studied the antimicrobial effects of plants and plant extracts in meat and products, and it has been reported that they reduce TMAB numbers at different rates (Çağlar et al., 2018; İncili et al., 2021; Jahan et al., 2018).

The number of psychrotrophic bacteria in the meatball samples was determined between 4.62-4.83 log<sub>10</sub> cfu/g on day 0 and 7.64-8.24 log<sub>10</sub> cfu/g on the last day of storage. It was determined that there was a continuous increase in the number of psychrotrophic bacteria in all groups in parallel with the storage period, and these increases made a statistically significant difference ( $P<0.05$ ). It has been reported that psychrotrophic bacteria increase during meat preservation and causes the meat to spoil (Doulgeraki et al., 2012). There was a statistically significant difference between the groups on the other days except day 0 during the storage period of the meatballs ( $P<0.05$ ). The CT group detected the lowest psychrotrophic bacteria count on the 4th and 8th days. On the 16th day of the storage, there was a 0.6 log<sub>10</sub> difference in the number of psychrotrophic bacteria between the control and the other groups. The lowest number of psychrotrophic bacteria was found in the CT group (7.63 log<sub>10</sub>). Indeed, it has been reported that the antimicrobial activity of CT fruit is high (Keser et al., 2019). The plants' effect on the number of psychrotrophic bacteria is due to the phenolic compounds they contain. Because phenolic compounds have an antimicrobial effect (Efenberger-Szmechtyk, 2020) the antimicrobial effects of plants and plant extracts in meat and products have been examined by many researchers, and it has been reported that they reduce the number of psychrotrophic bacteria at different rates (Can and Şahin 2019; Çağlar et al., 2018; İncili et al., 2021).

LAB counts of meatball samples were determined between 5.04-5.32 log<sub>10</sub> cfu/g on day 0 and 7.59-8.05 log<sub>10</sub> cfu/g on day 16 of storage. A continuous increase in LAB numbers was observed in all groups in parallel with the storage period, and it was determined that these increases made a statistically significant difference ( $P<0.05$ ). A statistically significant difference ( $P<0.05$ ) was detected between the groups during storage on the 4th, 8th, and 16th days. On the 4th day, there was a difference in LAB counts between the control group and PSC, NS, and CT groups, 0.6, 1.3, and 0.9 log<sub>10</sub>, respectively, and the lowest LAB count was found in the NS group (5.28 log<sub>10</sub>). On the 16th day, there was a 0.5 log<sub>10</sub> difference between the control and the other groups, and the lowest LAB count was observed in the NS (7.59 log<sub>10</sub>) group. The lowest LAB count was detected in the NS group on all storage days. It is thought that the effect

of the NS-containing group on the LAB number is because the phenolic compounds it contains suppress the LAB development more (Çağlar et al., 2018; Efenberger-Szmechtyk, 2020). Indeed, it has been reported that the antimicrobial activity of NS seed is high (Singh et al., 2014).

Yeast-mold count of meatball samples was determined 13.40-3.87 log<sub>10</sub> cfu/g on day 0 and 5.69-6.27 log<sub>10</sub> cfu/g on day 16 of storage. On the 4th day, yeast-mold counts were increased in the control and PSC groups, while a decrease in yeast-mold counts was observed in the NS and CT groups. It was determined that decreases and increases in yeast-mold numbers were observed in all groups during storage. This situation created a statistically significant difference ( $P<0.05$ ) in yeast-mold numbers within the group days. Similar to our findings, İncili et al. (2020) reported that the fluctuation in the number of yeast molds during the storage period in marinated poultry meat (drumstick, wing, breast meat) was due to the yeast-molds contained in the components they used in marinating. During storage, the lowest yeast-mold count was detected in the NS groups. This may be due to the antimicrobial effect of phenolic and volatile compounds contained in the NS seed on molds and yeasts (Ahmed and Albi, 2019; Çağlar et al., 2018). Yeast and mold counts in the PSC and CT groups showed similar results with the control group. The high yeast-mold counts of the groups containing PSC and CT fruits may be because the PSC and CT fruits used contain more yeast-mildew. Many researchers have studied the antimicrobial effects of plants and plant extracts in meat and products, and it has been reported that they reduce yeast-mold numbers at different rates (Can and Şahin, 2019; Daoutidou et al., 2021; El-Adawy et al., 2021).

Studies on the effects of PSC and CT fruits on the microbiological quality of foods were not found in the literature review. However, it has been reported that the antimicrobial properties of PSC and CT fruits are high (Arslan and Kaya, 2021; Ceylan et al., 2020; Keser et al., 2019). Similar to our findings, it has been reported by many researchers (Chauhan et al., 2018; Liao et al., 2021) that using NS seed or extract in meat and meat products has a positive effect on microbiological quality and extends the shelf life of the products.

In conclusion, it has been determined that PSC, CT fruits, and NS seeds have a bacteriostatic effect on the meatballs and prolong the shelf life. To extend the shelf life of meatballs, it can be recommended to use PSC, CT fruits, and NS seeds in their composition. This study's results can provide beneficial information for anyone dealing with food and further studies investigating the shelf life of meat and meat products.

## Acknowledgements

I would like to thank Firat University Scientific Research Projects Coordination Unit for financially supporting this study.

This study was produced from a part of the PhD thesis titled "Examining the Effect of Jerusalem Thorn (*Paliurus spina-shristi* Mill.), Oriental Hackberry (*Celtis tournefortii* L.) and Black Seed (*Nigella sativa* L.) on N(Epsilon)-

(Carboxymethyl) Lysine Formation, Sensory, Microbial Quality in Meatballs".

### Conflict of Interest

The authors stated that they did not have any real, 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".

### Funding

This study was supported by the Firat University Scientific Research Projects Coordination Unit, (Project Number: VF.21.08).

### 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: MEA, AA

Design: MEA

Control/Supervision: AA

Data Collection and / or Processing: MEA

Analysis and / or Interpretation: MEA, AA

Literature Review: MEA, AA

Writing the Article: MEA, AA

Critical Review: AA

### References

- Ahmed A, Albi A, 2019: Effect of some natural plants oils on the growth of some pathogenic bacteria. *Sci J Appl Sci Sabratha Univ*, 2 (3),1-19.
- AOAC, 1990: Official Methods of Analysis (15th ed.). Association of Analytical Chemists. Arlington, VA.
- AOAC, 1998: Crude protein in meat: block digestion method, 981.10. Official methods of analysis.
- AOAC, 2000: Official Methods of Analysis 991.36. (17th ed.). Association of Analytical Chemists. Arlington, VA.
- AOAC, 2002a: Determination of moisture content 950.46. Official methods of analysis.
- AOACb, 2002b: Ash of Meat 920.153. Official methods of analysis.
- Arslan S, 2021: Hayıt tohumu (*Vitex agnus-castus* L.) tozunun sığır köftelerinin çeşitli kalite özellikleri ve raf ömrü üzerine etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, NEVÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nevşehir.
- Arslan L, Kaya E, 2021: Investigation of Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Paliurus spina-christi* Mill. in Kahramanmaraş, Turkey. *KSU J Agric Nat*, 24 (6), 1161-116.
- Can ÖP, Şahin S, 2019: Effect of rosemary essential oil coated vacuum packaging on the quality of chicken meatballs at +4°

- C. *TURJAF*, 7 (12), 2165-2169.
- Casaburi A, Piombino P, Nychas GJ, Villani F, Ercolini D, 2015: Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food microbiol*, 45, 83-102.
- Ceylan Ş, Harsit B, Saral O, Özcan, M, Demir İ, 2020: Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of plant extracts Centaury (*Hypericum montbretii* and *Hypericum bupleuroides*) and Blackthorn (*Paliurus spina-christi* Mill.) in Artvin, Giresun region of Turkey. *ACU Orman Fak Derg*, 21 (1), 13-20.
- Chauhan P, Das AK, Nanda, PK, Kumbhar V, Yadav JP, 2018: Effect of *Nigella sativa* seed extract on lipid and protein oxidation in raw ground pork during refrigerated storage. *Nutr Food Sci*, 48 (1), 2-15.
- Çağlar MY, Veli G, Tomar O, Akarca G, 2018: Determination of the effect of different ground mustard seeds on quality characteristics of meatballs. *Korean J Food Sci Anim Resour Korean J Food Sci An*, 38 (3), 530.
- Daoutidou M, Plessas S, Alexopoulos A, Mantzourani I, 2021: Assessment of antimicrobial activity of pomegranate, cranberry, and black chokeberry extracts against foodborne pathogens. *Foods*, 10 (3), 486.
- Doulgeraki AI, Ercolini D, Villani F, Nychas GJE, 2012: Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int J Food Microbiol*, 157 (2), 130-141.
- Efenberger-Szmechtyk M, Nowak A, Czyzowska A, 2021: Plant extracts rich in polyphenols: Antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. *Crit Rev Food Sci Nut*, 61 (1), 149-178.
- El-Adawy TA, El-Beltagy AE, Atef AA, 2021: Antimicrobial and antioxidant efficacy of some natural plants extracts. *Menoufia J Food and Dairy Sci*, 6 (3), 33-34.
- Ercolini D, Ferrocino I, Nasi A, Ndagijimana M, Vernocchi P, La Storia A, Laghi L, Mauriello G, Guerzon ME, Villani F, 2011: Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions. *Appl Environ Microbiol*, 77 (20), 7372-7381.
- Gecibesler IH, 2019: Antioxidant activity and phenolic profile of Turkish *Celtis tournefortii*. *Chem Nat Compd*, 55 (4), 738-742.
- Halid SA, Rahim A, 2018: Physicochemical and microbiological characteristics of beef meatballs in Palu City. *AGROLAND Agric Sci J (e-Journal)*, 5 (2), 104-111.
- ISO 15214, 1998: Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria-colony-count technique at 30 °C.
- ISO 21527-1, 2008: Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds.
- İncili GK, Akgöl M, Aydemir ME, Alan S, Mutlu M, İlhak Oİ, Öksüztepe G, 2020: Fate of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium in homemade marinade and on marinated chicken drumsticks, wings and breast meat. *LWT*, 134, 110231.
- İncili GK, Aydemir ME, Akgöl M, Kaya B, Kanmaz H, Öksüztepe G, Hayaloğlu AA, 2021: Effect of *Rheum ribes* L. juice on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium and chemical quality on vacuum packaged raw beef. *LWT*, 150, 112016.
- Jahan I, Haque MA, Hashem MA, Rima FJ, Akhter S, Hossain MA, 2018: Formulation of valueadded beef meatballs with pomegranate (*Punica granatum*) extract as a source of natural antioxidant. *Int J Meat Sci*, 6 (1), 12-18.
- Kahraman E, 2021: Börülce (*Vigna unguiculata*) ununun Kırklareli köftesi üretiminde kullanım olanakları. Yüksek Lisans Tezi, NKÜ Fen Bil Enst, Tekirdağ.
- Keser S, Keser F, Kaygılı O, Tekin S, Turkoglu I, Demir E, Turkoglu S, Karatepe M, Sandal S, Kirbag S, 2017: Phytochemical

- compounds and biological activities of *Celtis tournefortii* fruits. *Ana. Chem Lett*, 7 (3), 344-355.
- Kirca A, Arslan E, 2008: Antioxidant capacity and total phenolic content of selected plants from Turkey. *Int J Food Sci*, 43 (11), 2038-2046.
- Lang KW, Steinberg MP, 1980: Calculation of moisture content of a formulated food system to any given water activity. *J Food Sci*, 45 (5), 1228-1230.
- Leistner L, 2000: Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int J Food Microbiol*, 55 (1-3), 181-186.
- Liao W, Badri W, Alhibshi AH, Dumas E, Ghnimi S, Gharsallaoui A, Errachid A, Elaissari A, 2021: Food Applications Of *Nigella Sativa* Essential Oil. In *Black Cumin (Nigella sativa) seeds: Chemistry, Technology, Functionality, and Applications*, Ramazan MF (ed), 433-455, Springer.
- Mahros MM, Abd-Elghany SM, Sayed-Ahmed MZ, Alqahtani SS, Sallam KI, 2021: Improving the microbiological quality, health benefits, and storage time of cold-stored ground mutton supplemented with black seed. *LWT*, 138, 110673.
- Mansur AR, Song EJ, Cho YS, Nam YD, Choi YS, Kim DO, Seo YS, Nam TG, 2019: Comparative evaluation of spoilage-related bacterial diversity and metabolite profiles in chilled beef stored under air and vacuum packaging. *Food Microbiol*, 77, 166-172.
- Nikmaram N, Budaraju S, Barba FJ, Lorenzo JM, Cox RB, Mallikarjunan K, Roohinejad S. 2018: Application of plant extracts to improve the shelf-life, nutritional and health-related properties of ready-to-eat meat products. *Meat Sci*, 145, 245-255.
- Prommachart R, Belem TS, Uriyapongson S, Rayas-Duarte P, Uriyapongson J, Ramanathan R. 2020: The effect of black rice water extract on surface color, lipid oxidation, microbial growth, and antioxidant activity of beef patties during chilled storage. *Meat Sci*, 164, 108091.
- Purba R, Suseno SH, Izaki AF, Muttaqin S, 2014: Application of liquid smoke and chitosan as natural preservatives for tofu and meatballs. *Int J Appl Sci* 4 (2), 2012-2017.
- Singh S, Das SS, Singh G, Schuff C, de Lampasona MP, Catalan CA, 2014: Composition, in vitro antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and oleoresins obtained from black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). *Biomed Res Int*, 2014, 918209.
- SPSS 2017: Windows user's guide, version 24.0, SPSS Inc, Michigan Ave, Illinois.
- Şen A 2018: Antioxidant and anti-inflammatory activity of fruit, leaf and branch extracts of *Paliurus spina-christi* P. Mill. *Marmara Pharm JI*, 22 (2), 328-333.
- Takım K, Işık M, 2020: Phytochemical Analysis of *Paliurus spina-christi* Fruit and Its Effects on Oxidative Stress and Antioxidant Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Appl Biochem Biotechnol*, 191 (4), 1353-1368.
- Takım K, 2021: Bioactive component analysis and investigation of antidiabetic effect of Jerusalem thorn (*Paliurus spina-christi*) fruits in diabetic rats induced by streptozotocin. *J Ethnoph*, 264,113263.
- USDA/FSIS 2011: Microbiology laboratory guidebook. Metot 3.01, Quantitative analysis of bacteria in foods as sanitary indicators.
- Yıldırım A, Duran M, Koç M, 2018: Su aktivitesinin ve farklı kurutma sistemlerinin biyoaktif bileşenlerin stabiliteleri üzerine etkisi. *Gıda*, 43 (3), 512-522.
- Yıldırım I, Uğur Y, Kutlu T, 2017: Investigation of antioxidant activity and phytochemical compositions of *Celtis tournefortii*. *Free Radic Antioxid*, 7 (2), 160-165.
- Yu L, Chai M, Zeng M, He Z, Chen J, 2018: Effect of lipid oxidation on the formation of Nε-carboxymethyl-lysine and Nε-carboxyethyl-lysine in Chinese-style sausage during storage. *Food Chem*, 269, 466-472.
- Zor M, Aydın S, Güner ND, Başaran N, Başaran AA, 2017: Antigenotoxic properties of *Paliurus spina-christi* Mill fruits and their active compounds. *BMC Complement Altern Med*, 17 (1), 1-10.
- Zwolan, A, Pietrzak D, Adamczak L, Chmiel M, Kalisz S, Wirkowska-Wojdyła M, Florowski T, Oszmiański J, 2020: Effects of *Nigella sativa* L. seed extracts on lipid oxidation and color of chicken meatballs during refrigerated storage. *LWT*, 130, 109718.





## Three Previously Unseen Genotypes Detected in IGFBP-3 Gene in Buffalo Breed

Yusuf ÖZŞENSOY<sup>1,a,\*</sup>, İnanç BARAL<sup>1,b</sup>

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Genetics, Sivas, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-2605-2410

<sup>b</sup>ORCID: 0000-0001-7272-3724

Received: 31.01.2023

Accepted: 04.04.2023

**How to cite this article:** Özşensoy Y, Baral I. (2023).

Three Previously Unseen Genotypes Detected in IGFBP - 3 Gene in Buffalo Breed. Harran Üniversitesi

Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 35-40,

DOI:10.31196/huvfd.1245427.

**\*Correspondence:** Yusuf ÖZŞENSOY

Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Genetics, Sivas, Türkiye.

e-mail: yusufozsensoy@yahoo.com

Available on-line at:

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Abstract:** Anatolian water buffalo breed is Turkey's sole water buffalo breed, and their numbers steadily increased with the national "Water Buffalo Breeding by Breeders Project". This study aimed to investigate the gene region polymorphisms (Intron-2, Exon-2/Intron-3, Exon-3) of the meat-yield-related Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3) gene in Anatolian water buffaloes by TaqI, HaeIII, and MspI restriction endonucleases. The phenol/chloroform method was used for DNA isolation from 151 blood samples, and extracted DNAs were amplified by touchdown PCR using specific primers. Amplified PCR products were digested with restriction endonucleases (REs) and separated in 3% agarose gel electrophoresis (AGE), then genotypes were determined. Results revealed two genotypes [AA (98.68%) and AC (1.32%)] and two alleles [A (0.99) and C (0.01)] for the Exon-2 to Intron-3 region from HaeIII digestion. TaqI digestion of the Intron-2 region revealed three genotypes [AA (7.94%), AB (3.97%), and BB (88.10%)] and two alleles [A (0.10) and B (0.90)]. MspI digestion of the Exon-3 region revealed only the AA genotype and A allele, thus revealing monomorphism. Overall, HaeIII digestion revealed insignificant polymorphism ( $P>0.05$ ), and TaqI digestion revealed significant polymorphism ( $P<0.001$ ) for their respective regions. Gene polymorphisms of these regions were investigated for the first time in Anatolian water buffaloes. Additionally, three novel genotypes for the IGFBP-3 gene (one from HaeIII and two from TaqI) were determined for the first time. The novel B allele from TaqI digestion was observed to have a substantial frequency.

**Keywords:** Anatolian water buffalo, HaeIII, IGFBP-3, PCR – RFLP, Sivas, Taq I.

### Mandalarda IGFBP-3 Geninde Daha Önce Görülmemiş Üç Genotip Tespit Edildi

**Özet:** Anadolu su mandası Türkiye'de yetiştirilen tek manda ırkıdır ve sayıları ülke genelinde "Halk Elinde Manda Yetiştiriciliği Projesi" ile artmıştır. Bu çalışmanın amacı, Anadolu Mandalarında et verimi ile ilgili olan insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein - 3 (IGFBP-3) geninin Taq I, Hae III ve Msp I restriksiyon enzimi (RE) ile gen polimorfizmlerinin (İntron 2, Exon 2 / İntron 3, Exon 3) araştırılmasıdır. Toplam 151 kan örneğinden Fenol/Kloroform yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır ve elde edilen DNA örnekleri spesifik primerler kullanılarak Touchdown PZR ile çoğaltılmıştır. Yükseltgenen PZR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilmiş, %3 agaroz jel elektroforez yönteminde ayrıştırılmış ve genotipler belirlenmiştir. Sonuç olarak, Hae III RE'nde (Exon 2 – İntron 3) AA (%98.68) ve AC (%1.32) 2 genotip ve A (0.99) ve C (0.01) 2 allel tespit edilmiştir. Taq I RE'nde (İntron 2) AA (%7.94), AB (%3.97) ve BB (%88.10) 3 genotip ve A (0.10) ve B (0.90) 2 allel ve Msp I RE'nde (Exon 3) ise sadece AA genotipi ve A alleli tespit edilmiştir. IGFBP-3 geninde Msp I enzimi monomorfik ( $P>0.05$ ), Hae III enzimi polimorfik fakat önemsiz ( $P>0.05$ ) bulunurken Taq I enzimi yönünden hem polimorfik hem de önemlilik tespit edilmiştir ( $P<0.001$ ). IGFBP-3 gen bölgelerinin polimorfizmleri Anadolu mandalarında ilk kez araştırılmıştır. Ayrıca IGFBP-3 geninde diğer manda ırklarında yapılan çalışmalardan farklı olarak ilk kez üç yeni genotip (Taq I enzim kesimi sonucunda iki, Hae III enzim kesimi sonucunda bir) tespit edilmiştir. Ayrıca Taq I enzim işlemi sonucu yeni tespit edilen B allelinin frekansı diğer allele göre çok yüksek bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Anadolu mandası, HaeIII, IGFBP-3, PZR-RFLP, Sivas, Taq I.

## Introduction

Water buffaloes naturally live in tropical and subtropical forests, water and rainfall-abundant wetlands, and marshlands. While water buffaloes are continental animals, they spend their time in mucks and river lines due to their quick dehydrating and water-dependent profiles (Hays, 2014; Michelizzi et al., 2010). The only water buffalo breed known to be bred in Turkey is the Anatolian water buffalo, a combined meat and milk-yielding breed (GDAR, 2011) classified under the river water buffaloes. The appearance of Anatolian water buffaloes was stated to be like the water buffaloes raised in the Mesopotamia region. Anatolian water buffaloes were subjected to artificial insemination in 2002 with semen imported from Italy (FAO, 2005). Migration routes of water buffaloes were stated to be from central Europe to Italy in the 6th century AD and from the Moroccan strait to Arabian-controlled Northern Africa region in the 7th century AD (Michelizzi et al., 2010). River water buffaloes, to which Anatolian water buffaloes belong, were stated to be originating from the Indian subcontinent and were domesticated 4 500 years ago (FAO, 2015).

Water buffalo meat is the capital product in Asian countries (FAO, 2005). For Turkey, water buffalo gross meat yield was 0.6% of total gross meat yield in 2021, which was calculated to be 8 424 tonnes in 2020, and 10 831 tonnes in 2021. With the effects of the "National Breeding Project of Water Buffaloes by the Breeders" in Turkey, the water buffalo counts have increased since 2010. The counts decreased only in 2021, but this decrease was coupled with increased meat production from water buffaloes (TurkStat, 2022a; TurkStat, 2022b).

It is reported that the cattle Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP-3) gene is located on bovine chromosome 4 (BTA 4) (Maciulla et al., 1997). However, no study currently indicates which chromosome contains the IGFBP-3 gene in water buffaloes. Other research on rat and human tissues identified six different IGFBP genes (IGFBP-1 to IGFBP-6). Of these six IGFBPs, the IGFBP-3 is the most abundant in human and animal serums. It is reported that the IGFBP-3 gene contains five exons and four introns (Shimasaki and Ling, 1991). It was demonstrated that there is a 93% amino acid similarity in the IGFBP-3 gene from water buffalo, cattle, and sheep species (Kumar et al., 2006).

Ramesha et al. (2015) studied the Intron-1 to Exon-2 regions of the IGFBP-3 gene in cattle and water buffaloes using the PCR-SSCP method. They found 2 SNPs in one cattle group and 3 SNPs in another, but they were seen as monomorphic in water buffaloes. The research were studied the IGFBP-3 gene in different cattle breeds by Choudhary et al. (2007), and HaeIII restriction endonuclease digestion was conducted in partial Intron-3, entire Intron-2 - Exon-3, and partial Exon-2 regions, which resulted in three genotypes (AA, AB, and BB) in two cattle breeds, and only one genotype (AA) in a cattle breed. These results stated that a significant relationship exists between these genotypes and birth and body weights; and the authors suggested that the AB genotype has more pronounced birth and body weights.

Padma et al. (2004) conducted PCR-RFLP research in 157

Indian water buffalo samples from breeds of Murrah, Surti, Jaffarabadi, and Nagpuri, where they digested entire Exon-3 and Intron-2, and partial Exon-2 and Intron-3 regions of the IGFBP-3 gene using three different restriction endonucleases (MspI, TaqI, and HaeIII). The authors stated that all samples provided a single genotype (AA) from HaeIII (Exon-2 - Intron-3), TaqI (Intron-2), and MspI (Exon-3) digestions.

Othman et al. (2014) investigated polymorphisms in the Exon-2 - Intron-3 region of the IGFBP-3 gene in 46 samples of Egyptian cattle by using three different restriction endonucleases (MspI, TaqI, and HaeIII). Their results provided three genotypes (AA, AC, and CC) from HaeIII digestion and a single genotype from MspI and TaqI digestions. While the HaeIII digestion results of their study were the same as other results obtained in cattle, the authors preferred using C in genotype naming. Othman et al. (2018) investigated gene polymorphism of the IGFBP-3 gene in 100 samples of Egyptian water buffalo using three different restriction endonucleases (MspI, TaqI, and HaeIII) but did not obtain polymorphism from any of the three digestions.

Research is necessary for water buffaloes to reveal their yield potentials and utilization of molecular selection, which is due to the variation present in their DNA sequences. Therefore, the importance of molecular studies on yield potentials is increasing. Investigation of gene polymorphisms of the meat yield-related IGFBP-3 gene using the PCR-RFLP method in Anatolian water buffaloes that were part of the National Breeding Project of Water Buffaloes by the Breeders in Sivas province was aimed in this research.

## Material and Methods

The study material was composed of 151 Anatolian water buffalo blood samples that were present in the laboratory (Animals were born between 2014 and 2015, were unrelated to each other, and were clinically healthy. Of the 151 animals, 112 were female, and 39 were male). DNA isolation from blood samples was conducted using the standard phenol/chloroform method (Sambrook et al., 1989). DNA isolated from each sample was amplified by using touchdown (TD) PCR (Don et al., 1991) protocol with the IGFBP-3-specific primer pairs (Table 1). Each PCR mixture was prepared in 25 µL volumes and contained 12.5 µL 2x PCR MasterMix (Ampliqon), 10 pM from each primer, approximately 100 ng of DNA template, and ultrapure water. Each PCR mixture was subjected to the following TD-PCR profile: (1) first denaturation at 96 °C for 10 min, 16 cycles of (2) denaturation at 96 °C for 30 sec, (3) primer annealing starting at 60 °C and decreasing by 0.5 °C at each cycle to 52 °C for optimal annealing for 45 sec, (4) extension at 72 °C for 1 min, 25 cycles of (5) denaturation at 96 °C for 30 sec, (6) primer annealing at 52 °C for 45 sec, (7) extension at 72 °C for 1 min, and (8) final extension at 72 °C for 10 min for complete adenylation. Each amplified PCR product was subjected to 2% agarose gel electrophoresis (AGE) at 100 VA for 65 min and visualized in a UV transilluminator at 365 nm wavelength.

Obtained PCR products were digested with restriction

endonucleases detailed in Table 1. Digestion mixtures were prepared in 31 uL volumes and contained in each mixture 10 uL PCR product, 1 uL respective FastDigest RE (10 U per uL), 2 uL digestion buffer solution, and 18 uL ultrapure water. Prepared digestion mixtures for *HaeIII* and *MspI* were incubated at 37 °C for 20 to 25 min, and mixtures for *TaqI* were incubated at 65 °C for 20 to 25 min. Digested products were separated in 3% AGE at 100 VA for 60 to 70 min and were visualized in a UV transilluminator at 365 nm wavelength. The band sizes to determine genotypes resulting from digestions are shown in Table 2.

Genotype forms and allele frequencies of the samples were determined by gene counting. Polymorphic differences were assessed by conducting a Chi-square analysis. This study was approved by the Cumhuriyet University Animal Experiments Local Ethics Committee (02.23.2016, 65202830-050.04.04-24 Number Ethics Committee Decision).

## Results

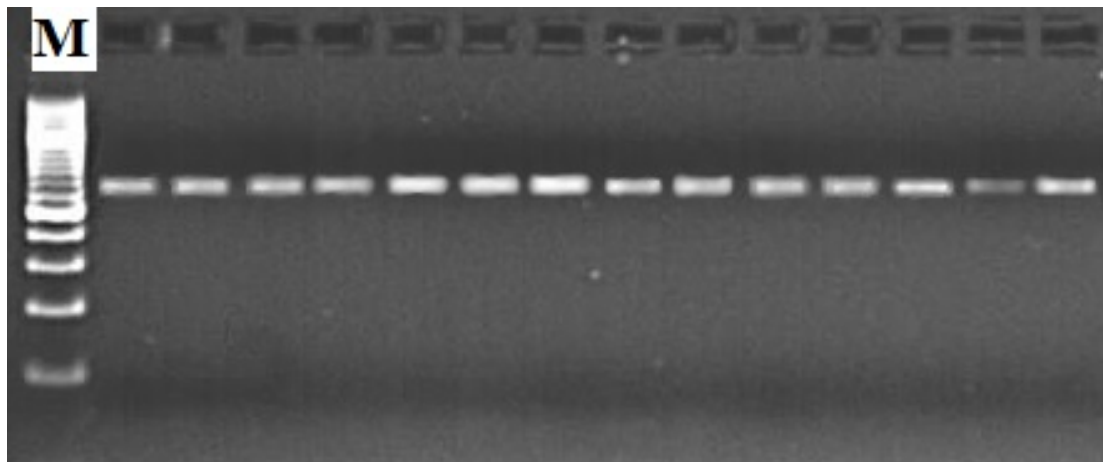
According to the PCR results of the IGFBP-3 gene region amplifications, all 151 samples were used for *HaeIII* and *MspI* digestions for their respective regions, and 126 samples were used for *TaqI* digestions (Figure 1). *HaeIII* digestion was used for polymorphism investigations in Exon-2 - Intron-3 region, *TaqI* digestion was used for the Intron-2 region, and *MspI* digestion was used for the Exon-3 region (Figure 2). Observed

and expected allele genotypes and frequencies were determined from the obtained polymorphisms (Table 3).

Results provided genotypes of AA (98.68%) and AC (1.32%) in the Exon-2 to Intron-3 region of the IGFBP-3 digested with *HaeIII* (Figure 2). The novel AC genotype and C allele (0.01) were determined for the first time in this study. Since there is no prior information about these genotypes, the AC genotype, which is a 655 bp band presence together with the AA genotype, was named for the first time in this study.

The *TaqI* digestion of the Intron-2 region of the IGFBP-3 gene provided the previously documented AA genotype (7.94%) but provided two novel genotypes of AB (3.97%) and BB (88.10%), which were not reported previously. Since there is no prior information about these genotypes, the genotype with 655 bp band together with 415 bp and 240 bp bands was named AB, and the genotype with only 655 bp band was named BB for the first time in this study (Figure 2). The novel B allele was determined to have a substantial frequency of 0.90 (Table 3).

The *MspI* digestion of the Exon-3 region of the IGFBP-3 gene provided only the AA genotype and was thus determined as monomorphic. The polymorphism observed in the Exon-2 - Intron-3 region (for *HaeIII*) was determined as statistically insignificant ( $P>0.05$ ), but the polymorphism observed in the Intron-2 region (for *TaqI*) was determined as statistically significant ( $P<0.001$ ) (Table 3).

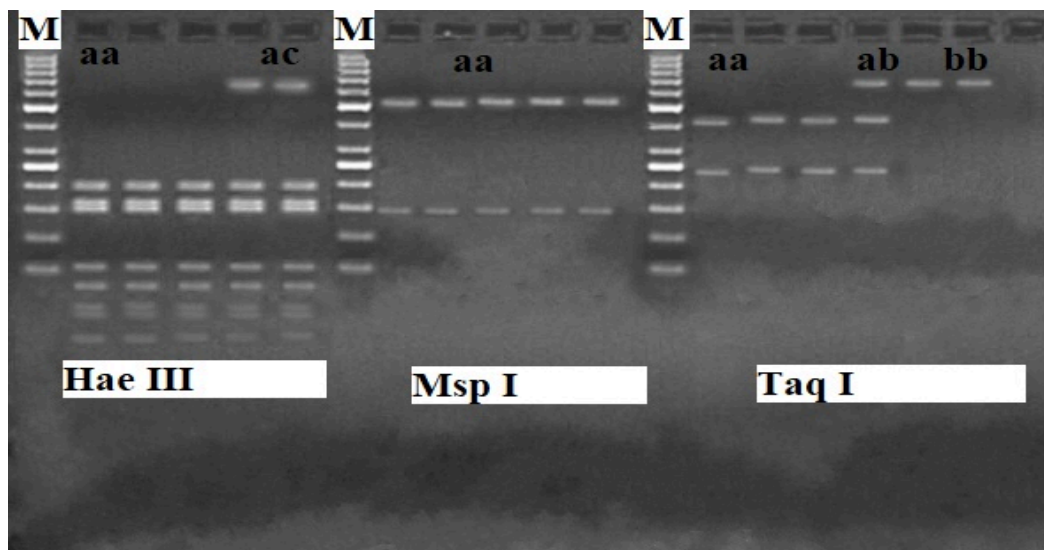


**Figure 1.** PCR results of the IGFBP-3 gene region (M: 100 bp DNA Ladder; Product sizes: 655 bp).

**Table 1.** List of the primer sequences and restriction endonucleases.

Locus	Primer sequence (5' → 3')	PCR(bp)	RE	Reference
IGFBP - 3	F: 5' - CCAAGCGTGAGACAGAATAC - 3'	655	<i>HaeIII</i>	Maciulla et al., 1997
	R: 5' - AGGAGGGATAGGAGCAAGTT - 3'		<i>TaqI</i>	
			<i>MspI</i>	Padma et al., 2004

F: Forward, R: Reverse, RE: restriction endonuclease, bp: base pair.



**Figure 2.** Restriction endonuclease digestion results of the IGFBP - 3 gene (M: 50 bp DNA Ladder).

**Table 2.** Obtaining of genotypes from the Insulin - like Growth Factor Binding Protein - 3 (IGFBP - 3) gene.

Gene	PCR (bp)	RE Digestion	AA (bp)	AB (bp)	BB (bp)	AC (bp)
Exon 2 - Intron 3 (Cattle)	651	<i>HaeIII</i>	199, 164, 154, 56, 36, 18, 16, 8	215, 199, 164, 154, 56, 36, 18, 16, 8	215, 164, 154, 56, 36, 18, 8,	
Exon 2 - Intron 3 (Buffalo)	655	<i>HaeIII</i>	<b>201, 165</b> , 154, 56, 36, <b>19</b> , 16, 8	215, <b>201, 165</b> , 154, 56, 36, <b>19</b> , 16, 8	215, <b>165</b> , 154, 56, 36, <b>19</b> , 8,	<b>655, 201, 165</b> , 154, 56, 36, <b>19</b> , 16, 8 (in this study)
Intron 2	655	<i>TaqI</i>	415, 240	655, 415, 240 (in this study)	655 (in this study)	
Exon 3	655	<i>MspI</i>	510, 145	-	-	

RE: restriction endonuclease, bp: base pair.

**Table 3.** Chi - square analysis, frequencies, and significances of genotypes and alleles obtained from the Insulin - like Growth Factor Binding Protein - 3 (IGFBP - 3) gene.

Gene	n	Genotype Frequency			Allele Frequency		$\chi^2$	P - Values (df = 1)
		AA O (E)	AC O (E)	CC O (E)	A	C		
Exon 2 -Intron 3 ( <i>HaeIII</i> )	151	149 (149.01) %98.68	2 (1.99) %1.32	-	0.99	0.01	0.007	0.9347 ns
Exon 3 ( <i>MspI</i> )	151	151 (151)	-	-	1	0	0	1.00 ns
Intron 2 ( <i>TaqI</i> )	126	10 (1.24) %7.94	5 (22.52) %3.97	111 (102.24) %88.10	0.10	0.90	76.26	0.0000***

O: Observed genotype; E: Expected genotype; n: Sample count; df: Degree of freedom;  $\chi^2$ : Chi - square value; ns: not significant (P > 0.05); \*\*\*: P < 0.001.

## Discussion and Conclusion

The same primer sequences for the IGFBP-3 gene regions result in 651 bp PCR product in cattle (Maciulla et al.,

1997), 655 bp product in water buffaloes (Padma et al., 2004), and 654 bp product in sheep (Kumar et al., 2006). The similarity of the IGFBP-3 gene between these three species was reported as 88.54% - 95.06% (Saleh et al., 2019).

Phylogenetic results conducted on four species (cattle, buffalo, goat, and sheep) on the IGFBP gene family summarily revealed a closer relationship between *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* for genes IGFBP-1 to IGFBP-6 but not for IGFBP-7. Close relationship is also apparent between *Capra hircus* and *Ovis aries*, except for IGFBP-2 and IGFBP-7 genes (Rehman et al., 2022). Therefore, it is suggested that the IGFBP-3 gene region can be used as a marker for specie determination (Padma et al., 2004). Within the scope of the present study, polymorphism in three regions of the IGFBP-3 gene was investigated in Anatolian water buffaloes for the first time.

Present results provided a single genotype (AA) from MspI digestion of the Exon-3 region in all samples; however, HaeIII digestion of the Exon-2 to Intron-3 regions revealed two genotypes (*one of them is for the first time in this study*), and TaqI digestion of Intron-2 region revealed three genotypes (*two of them are for the first time in this study*) in this study (Figure 2; Table 3). Of the two polymorphic regions, only the region digested with TaqI was found to be statistically significant. The same Exon-2 - Intron-3 region digested with HaeIII in cattle was provided with three genotypes (AA, AB, BB) in two cattle breeds and a single genotype (AA) in one cattle breed (Choudhary et al., 2007). Gene region polymorphisms of the IGFBP-3 in water buffaloes (Ramesha et al., 2015; Saleh et al., 2019), Egyptian sheep (El-Hanafy and Salem, 2009; Saleh et al., 2019), and Indian sheep (Kumar et al., 2006) provided monomorphic results. A short segment of the IGFBP-3 investigated in Egyptian goats provided monomorphic results (Saleh et al., 2019), whereas Chinese goats provided polymorphic results for the same segment (Lan et al., 2007; Lan et al., 2009). Overall, the HaeIII digestion region is considered monomorphic for water buffaloes and sheep but is polymorphic for cattle with three different genotypes (Kumar et al., 2004; Saleh et al., 2019; Saleh et al., 2022). For the first time in this study, both HaeIII and TaqI digestion regions of the IGFBP-3 gene were found to be polymorphic in Anatolian water buffaloes.

The HaeIII digestion of the IGFBP-3 gene in the Anatolian Black cattle breed, which is one of the native Turkish cattle breeds, and in one culture cattle breed (Holstein-Friesian) provided monomorphic results in Anatolian Black samples, whereas Holstein-Friesian samples provided polymorphic results (Fadhil et al., 2020). In the present study, the same gene region digested with HaeIII in Anatolian water buffaloes, a native breed for Turkey, provided polymorphic results in contrast to the Anatolian Black cattle breed.

The same regions of the IGFBP-3 gene studied in the present study were investigated previously and provided the AA genotype as monomorphic (Padma et al., 2004). The same regions of the IGFBP-3 gene were studied previously using the same REs in Egyptian cattle (Othman et al., 2014) and Egyptian water buffaloes (Othman et al., 2018), and a single genotype was obtained from both cattle and water buffaloes digested with TaqI and MspI REs. In contrast, water buffaloes were determined as monomorphic from HaeIII digestion. In the present study, more water buffalo samples

were studied compared to the previous studies conducted on water buffalo breeds, and three novel genotypes, one from the HaeIII digestion region and two from the TaqI digestion region, were determined for the first time. These novel genotypes were not obtained in prior studies on different species in other countries (Ali et al., 2009; Fadhil et al., 2020; Kumar et al., 2006; Lan et al., 2007; Ramesha et al., 2015). Since there is no prior information about these novel genotypes, naming these genotypes and alleles was done in this study for the first time. Again, in contrast to previous studies, the B allele obtained from TaqI digestion was found to have a higher frequency. It is considered that this novel allele and the genotypes might be inherent to the Anatolian water buffalo breed.

In conclusion, the gene regions of IGFBP-3 were reported typically as monomorphic in previous studies in water buffaloes. However, in the present study, three novel genotypes from HaeIII and TaqI digestion regions were obtained and subsequently named for the first time. Although the study population was limited only to Sivas province and no phenotypic analysis was conducted for the revealed polymorphisms, novel genotypes are noteworthy. To precisely determine these genotypes and upload their data to the GenBank, it is important to conduct sequence analysis on these samples. Especially for TaqI polymorphisms, further and concise research is necessary to reveal its phenotypic effects in Anatolian Water Buffalo breed.

### 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 Cumhuriyet University Animal Experiments Local Ethics Committee (02.23.2016, 65202830-050.04.04-24 Number Ethics Committee Decision). In addition, the authors declared that Research and Publication Ethical rules were followed.

### Funding

This research was supported by the Scientific Research Project Fund of Sivas Cumhuriyet University under project number V - 051.

### Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 6% (excluding abstract and references) as stated in the report uploaded to the system.

### Acknowledgement

This research was supported by the Scientific Research Project Fund of Sivas Cumhuriyet University under project

number V - 051. We want to thank Prof. Dr. Haki KARA for organizing the collection of samples in this study.

## Explanation

The study was presented as an oral presentation to IV. Balkan Agricultural Congress, August 31 – September 2nd 2022, Edirne, Türkiye.

## Author Contributions

Motivation / Concept: YO

Design: YO

Control/Supervision: YO

Data Collection and / or Processing: YO, İB

Analysis and / or Interpretation: YO, İB

Literature Review: YO

Writing the Article: YO, İB

Critical Review: YO

## References

- Ali BA, El-Hanafy AA, Salem HH, 2009: Genetic biodiversity studies on IGFBP-3 gene in Egyptian sheep breeds. *Biotechnol Anim Husb*, 25 (1-2), 101-109.
- Choudhary V, Kumar P, Bhattacharya TK, Bhushan B, Sharma A, Shukla A, 2007: DNA polymorphism of insulin-like growth factor-binding protein-3 gene and its association with birth weight and body weight in cattle. *J Anim Breed Genet*, 124, 29-34.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS, 1991: 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*, 19, 4008.
- EL-Hanafy AA, Salem HH, 2009: PCR-RFLP of IGFBP3 gene in some Egyptian sheep breeds. *American-Eurasian J Agric & Environ Sci*, 5 (1), 82-85.
- Fadhil M, Aytekin İ, Zülkadir U, 2020: Polymorphism in Anatolian Black and Holstein Friesian cattle breeds. *Selcuk J Agr Food Sci*, 34 (2), 137-140.
- FAO, 2005: Buffalo Production and Research. Edited by Antonio Borghese. REU technical Series 67. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ah847e/ah847e.pdf>. Accessed 16 July 2019.
- FAO, 2015: The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture, edited by B.D. Scherf and D. Pilling. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome. <http://www.fao.org/3/a-i4787e/index.html>. Accessed 16 July 2019.
- Hays J, 2014: Water Buffaloes. Facts and details, Asian and Asians-International and Economic Issues <http://factsanddetails.com/asian/cat62/sub408/entry-2830.html>. Accessed 16 March 2019.
- GDAR, 2011: Domestic animal genetics resources in Turkey. Republic of Turkey, Ministry of Food Agriculture and Livestock, General Directorate of Agricultural Research and Policy, Ankara, Türkiye.
- Kumar P, Choudhary V, Padma B, Shukla A, Misra A, Bhattacharya TK, Bhushan B, Sharma A, 2004: Buffalo Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) gene polymorphism and its comparison with cattle. *Buffalo J*, 2, 183-192.
- Kumar P, Choudhary V, Kumar KG, Bhattacharya TK, Bhushan B, Sharma A, Mishra A, 2006: Nucleotide sequencing and DNA polymorphism studies on IGFBP-3 gene in sheep and its comparison with cattle and buffalo. *Small Rum Res*, 64, 285-292.
- Lan XY, Pan CY, Chen H, Lei CZ, Liu SQ, Zhang YB, Min LJ, Yu J, Li JY, Zhao M, Hu SR, 2007: The HaeIII and XspI PCR-RFLPs detecting polymorphisms at the goat IGFBP-3 locus. *Small Rum Res*, 73, 283-286.
- Lan XY, Pan CY, Zhang CL, Hu SR, Liu SQ, Zhang YB, Lei CZ, Chen H, 2009: Relationships between polymorphisms of IGFBP-3 gene and Cashmere traits in Cashmere goats. *J App Anim Res*, 35 (1), 29-32.
- Maciulla JH, Zhang HM, DeNise SK, 1997: A novel polymorphism in the bovine insulin-like growth factor binding protein-3 (IGBP3) gene. *Anim Genet*, 28, 375.
- Michelizzi VN, Dodson MV, Pan Z, Amaral MEJ, Michal JJ, McLean DJ, Womack JE, Jiang Z, 2010: Water buffalo genome science comes of age. *Int J Biol Sci*, 6 (4), 333-349.
- Othman OE, Alam SS, El-Aziem SHA, 2014: Single nucleotide polymorphism in Egyptian cattle insulin-like growth factor binding protein-3 gene. *JGEB*, 12, 143-147.
- Othman OE, Abou-Eisha A, El-Din AE, 2018: Study on genetic polymorphism of IGFBP-3 gene in Egyptian buffalo. *ARRB*, 29 (3), 1-7.
- Padma B, Kumar P, Choudhary V, Dhara SK, Mishra A, Bhattacharya TK, Bhushan B, Sharma A, 2004: Nucleotide sequencing and PCR-RFLP of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 gene in riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Asian Austral J Anim*, 17, 910-913.
- Ramesha KP, Rao A, Basavaraju M, Geetha GR, Katakataware MA, Jeyakumar S, 2015: Genetic variability of bovine GHR, IGF-1 and IGFBP-3 genes in Indian cattle and buffalo. *S Afr J Anim Sci*, 45 (5), 485-493.
- Rehman MS, Mushtaq M, Hassan F, Rehman Z, Mushahid M, Shokrollahi B, 2022: Comparative genomic characterization of insulin-like growth factor binding proteins in cattle and buffalo. *BioMed Res Int*, 2022, 5893825.
- Saleh AA, Rashad AMA, Hassanine NNAM, Sharaby MA, Zhao Y, 2019: Comparative analysis of IGFBP-3 gene sequence in Egyptian sheep, cattle, and buffalo. *BMC Res Notes*, 12, 623.
- Saleh AA, Hammouf MH, Dabour NA, Hafez EEE, Sharaby MA, 2022: Genetic variability in GH and IGFBP-3 genes and their association with growth performance in Egyptian sheep. *Appl Vet Res*, 1(3): e2022012.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989: Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Pres. Cold Spring Harbor.
- Shimasaki S, Ling N, 1991: Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Progress in Growth Factor Research*, 3, 243-266.
- TurkStat, 2022a: Animal Production Statistics, December 2021. In: TurkStat News Bulletin. Number: 45593, Data:09.02.2022. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Aralik-2021-45593>. Accessed 01 May 2022.
- TurkStat, 2022b: Red Meat Production Statistics, 2020-2021. TurkStat News Bulletin. Number: 45671, Data: 06.05.2022. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Kirmizi-Et-Uretim-Istatistikleri-2020-2021-45671>. Accessed 01 Jun 2022.



## Evaluation of the Usage of Wafer Waste as an Easily Soluble Carbohydrate Source in Alfalfa Silage

Sadık Serkan AYDIN<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>Harran University, Faculty of Veterinary Medicine,  
Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases,  
Şanlıurfa, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-3252-3944

Received: 07.03.2023

Accepted: 28.03.2023

**How to cite this article:** Aydın SS. (2023). Evaluation of the Usage of Wafer Waste as an Easily Soluble Carbohydrate Source in Alfalfa Silage. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 41-46, DOI:10.31196/huvfd.1261498.

**\*Correspondence:** Sadık Serkan AYDIN

Harran University, Faculty of Veterinary Medicine,  
Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases,  
Şanlıurfa, Turkey.  
e-mail: sadik.aydin@harran.edu.tr

Available on-line at: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Abstract:** This study examined the addition of wafer waste as a readily soluble carbohydrate source to alfalfa silage for its impact on silage quality, fermentation characteristics, *in vitro* organic matter digestion, and *in vitro* CH<sub>4</sub> values. Fresh alfalfa was ensiled with 0% wafer waste (Control), 1% wafer waste, 2% wafer waste, 4% wafer waste, and 6% wafer waste for 60 days. The differences between the groups in dry matter (DM), crude protein (CP), crude ash (CA), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), metabolizable energy (ME), *in vitro* organic matter digestion (IVOMD), and *in vitro* CH<sub>4</sub> values of silages were found to be statistically significant. In comparison to the control group, increases in IVOMD and ME values were seen in all additive-containing groups. Depending on the quantity of wafer waste, the pH, ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N/TN), and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) values of the silages declined. In the study, the highest amount of lactic acid occurred in the group with 6% wafer waste added. Propionic acid (PA) was detected only in the control group. Butyric acid (BA) values tended to decrease depending on the addition of wafer waste and were not found in the groups to which 4% and 6% wafer waste addition. Yeast and mold values of the silages decreased in parallel with the increase in the wafer waste rate. As a result, it was determined that adding wafer waste as an easily soluble carbohydrate source positively affected alfalfa silage quality and fermentation characteristics.

**Keywords:** Alfalfa, Fermentation, Silage.

### Yonca Silajında Kolay Çözünebilir Karbonhidrat Kaynağı Olarak Gofret Atıklarının Kullanımının Değerlendirilmesi

**Özet:** Bu çalışmada, yonca silajına kolay çözünür bir karbonhidrat kaynağı olarak gofret atığının ilavesinin silaj kalitesi, fermantasyon özellikleri, *in vitro* organik madde sindirimi ve *in vitro* CH<sub>4</sub> değerleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Taze yonca bitkisi %0 gofret atığı (Kontrol), %1 gofret atığı, %2 gofret atığı, %4 gofret atığı ve %6 gofret atığı ile 60 gün süreyle silolanmıştır. Silajların kuru madde (KM), ham kül (HK), ham protein (HP), asit deterjan fiber (ADF), nötral deterjan fiber (NDF), *in vitro* organik madde sindirimi (IVOMS), metabolize olabilir enerji (ME) ve *in vitro* CH<sub>4</sub> değerlerinde gruplar arasında farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Silajların IVOMS ve ME değerleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla tüm katkılı gruplarda artışlar gözlemlenmiştir. Gofret atıklarının miktarına bağlı olarak silajların pH, amonyak nitrojeni (NH<sub>3</sub>-N/TN) ve karbondioksit (CO<sub>2</sub>) değerlerinde düşüş gözlemlenmiştir. Çalışmada en yüksek laktik asit miktarı %6 gofret atığı eklenen grupta oluşmuştur. Propiyonik asit (PA) sadece kontrol grubunda tespit edilmiştir. Bütirik asit (BA) değerleri ise gofret atığı ilavesine bağlı olarak azalma eğilimi göstermiş ve %4 ve %6 gofret atığı ilave edilen gruplarda tespit edilememiştir. Silajların maya ve küf değerleri gofret fire oranındaki artışa paralel olarak azalmıştır. Sonuç olarak kolay eriyebilir karbonhidrat kaynağı olarak gofret atığı ilavesinin yonca silaj kalitesi ve fermantasyon özellikleri üzerine olumlu etkisinin olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Fermentasyon, Silaj, Yonca.

## Introduction

Alfalfa, the so-called "queen of forages", is one of the world's most widely cultivated forage crops. Alfalfa is consumed by various animals, including ruminants (cattle, sheep, and goats) and non-ruminants (mainly horses). One of the essential characteristics of alfalfa is its high nutritional quality as an animal forage. It is used in animal forage as fresh green forage or silage, pellets, or cubed products. The most crucial feature of alfalfa is its high energy, protein content, and digestibility (Karabulut and Filya, 2007). Preserving forage crops as silage in humid regions can improve dry matter utilization and forage quality by reducing space and storage losses compared to dry grass. Successful ensiling of legume green forages without additives is quite tricky (König, 2020). It is reported that this situation, which is especially valid for alfalfa, arises mainly from 3 reasons (McDonalds et al., 1991). These are the high buffer capacity of legumes, low water-soluble carbohydrate content, and low dry matter content it has. In recent years, studies have been carried out using various silage additives that enable the production of high-quality legume green grass silages by eliminating these negativities, and high-quality alfalfa silage has been obtained. These additives are especially inoculants to improve fermentation in alfalfa silage (Koç et al., 2017), sugar-based fermentable liquids (Denek et al., 2011), carbohydrate sources (Şakalar and Kamalak, 2016) and fermentation-limiting organic acid additives (Ke et al., 2017).

This study was conducted to determine the effects of adding wafer waste, one of the food industry wastes causing environmental pollution, to alfalfa silage as a readily soluble carbohydrate source on silage quality, fermentation characteristics, and *in vitro* organic matter digestion and *in vitro* CH<sub>4</sub> values.

## Material and Method

In this study, the alfalfa (*Medicago sativa*) plant was used as silage raw material. The buffer capacity of fresh alfalfa used in the study was determined according to the method reported by Playne and McDonald (1966). In the study, while additive-free alfalfa plants constituted the control group, the groups with 1%, 2%, 4%, and 6% wafer waste additions constituted the test groups. The control and each test group were ensiled in 1.5-liter glass jars with four replicates. Before the silages were opened, they were kept in the dark place for 60 days to complete the fermentation. After removing the top 3–5 cm of the jars, 25 g of homogeneously sampled silage was shredded in a blender for 2 minutes with 100 ml of pure water. The pH of the resulting liquid was then promptly measured with a pH meter and recorded. The silage liquid from the blender was filtered, transferred to 10 ml tubes, and treated with 0.1 ml of 1M HCl to evaluate ammonia nitrogen and 0.25 ml of 25% metaphosphoric acid to analyze volatile fatty acids and lactic acid before being placed in a deep freezer (-20 °C) until analysis. NH<sub>3</sub>-N/TN analyses of silage samples were carried out according to the method reported by Broderick and Kang (1980). The method described by Suzuki and Lund was used to assess the concentrations of

volatile fatty acids (butyric, acetic, and propionic acid) and lactic acid. (1980). High-performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu L.C-20 AD HPLC pump, Shimadzu SPD M20A Detector (DAD), Shimadzu SIL-20 ADHT Autosampler, Isepe Coregel (87H3 colon), Shimadzu CTO-20AC Columun oven) apparatus was employed for this. The silages obtained in the study were subjected to an aerobic stability test (determination of CO<sub>2</sub> production values) for five days (Ashbell et al., 1991).

The silages prepared for this investigation were subjected to dry matter (DM), crude ash (C), and crude protein (CP) analysis by AOAC guidelines (2005). As per Van Soest et al. (1991), NDF and ADF analyses were carried out. Fresh alfalfa and silage samples were dried in an oven at 65 °C for 48 hours, and then samples were ground through a 1 mm sieve with a laboratory mill for composition analysis. The silages obtained in the study had their metabolizable energy (ME), *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD), and *in vitro* methane (CH<sub>4</sub>) content assessed using the method described by Menke and Steingass (1988). Yeast and mold analysis of the silages were determined according to the method reported by Filya et al. (2000).

All data of chemical composition and fermentation parameters were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) using SPSS statistics (IBM, Armonk, NY, USA). Duncan's test was employed for multiple comparisons.  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  indicated significant and highly significant, respectively.

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

## Results

The nutrient analysis results of the alfalfa plant used as silage material and wafer waste used as an additive in the study are presented in Table 1.

The nutrient contents, IVOMD, ME, and *in vitro* CH<sub>4</sub> values of the silages prepared by adding different ratios (1%, 2%, 4%, and 6%) of wafer waste to alfalfa plants are given in Table 2.

Within the scope of this study, the fermentation characteristics of the silages prepared by adding different ratios of wafer waste as an easily soluble carbohydrate source to alfalfa plant and the correlation results of the performed analyzes are given in Table 3 and Table 4.

## Discussion and Conclusion

In the present study, when Table 2 was examined, the differences between the groups in DM, CP, CA, NDF, ADF, ME, IVOMD, and *in vitro* CH<sub>4</sub> values of the silages were found statistically significant ( $P < 0.05$ ).

When the DM contents of the silages prepared by adding different ratios of wafer waste to alfalfa plants were examined, an increase was observed in DM levels in parallel



with the increase in wafer waste addition compared to the control group. It was concluded that this increase in DM level was due to the high DM level (98.75%) of wafer waste. A

decrease was observed when CA values were examined due to adding wafer waste. The low CA level (0.85%) of wafer waste caused this decrease.

**Table 1.** Crude nutrient analysis results of alfalfa plant used as silage material and wafer waste used as additive in the study.

	BC	DM	CA	CP	ADF	NDF	IVOMD	ME	CH <sub>4</sub>
Alfalfa	452	23.55	10.90	16.68	32.99	58.34	52.75	7.52	7.85
Wafer Waste	-	98.75	0.85	6.2	-	-	76.89	11.65	10.25

**BC:** Buffering capacity meq/kg DM, **DM:** Dry matter, %; **CA:** Crude ash DM%; **CP:** Crude protein, DM%; **ADF:** Acid detergent insoluble fiber, %DM; **NDF:** Neutral detergent insoluble fiber, %DM; **IVOMD:** *In Vitro* organic matter digestion %, **ME:** Metabolizable energy, **CH<sub>4</sub>:** *In Vitro* methane gas (%).

**Table 2.** The nutrient contents and IVOMD, ME and *in vitro* CH<sub>4</sub> values of alfalfa silages prepared by adding different ratios of wafer waste.

Groups	DM	CA	CP	ADF	NDF	IVOMD	ME	CH <sub>4</sub>
Control	20,71 <sup>d</sup>	13,14 <sup>a</sup>	17,68 <sup>a</sup>	36,21 <sup>a</sup>	48,67 <sup>a</sup>	45,91 <sup>c</sup>	6,70 <sup>c</sup>	6,68 <sup>b</sup>
1%wafer waste	22,02 <sup>cd</sup>	11,20 <sup>b</sup>	17,21 <sup>b</sup>	35,08 <sup>a</sup>	45,63 <sup>b</sup>	49,77 <sup>c</sup>	7,31 <sup>c</sup>	7,53 <sup>b</sup>
2% wafer waste	22,77 <sup>c</sup>	10,35 <sup>c</sup>	17,19 <sup>b</sup>	32,90 <sup>b</sup>	44,78 <sup>bc</sup>	56,24 <sup>b</sup>	8,31 <sup>b</sup>	9,87 <sup>a</sup>
4% wafer waste	24,71 <sup>b</sup>	9,53 <sup>d</sup>	16,98 <sup>b</sup>	32,58 <sup>b</sup>	44,01 <sup>c</sup>	63,24 <sup>a</sup>	9,41 <sup>a</sup>	10,23 <sup>a</sup>
6% wafer waste	26,79 <sup>a</sup>	9,28 <sup>d</sup>	15,94 <sup>c</sup>	32,55 <sup>b</sup>	41,10 <sup>d</sup>	64,30 <sup>a</sup>	9,56 <sup>a</sup>	10,71 <sup>a</sup>
SEM	0,528	0,335	0,138	0,407	0,593	1,806	0,280	0,431
P	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>

<sup>a-c</sup>: Values with different letters in the same column were found to be different (P<0.05), **DM:** Dry matter, %; **CA:** Crude ash DM%, **CP:** Crude protein, DM%, **ADF:** Acid detergent insoluble fiber, %DM, **NDF:** Neutral detergent insoluble fiber, %DM, **IVOMD:** *In Vitro* organic matter digestion %, **ME:** Metabolizable energy, **CH<sub>4</sub>:** *In Vitro* methane gas (%).

**Table 3.** Fermentation characteristics of alfalfa silages prepared by adding different ratios of wafer waste.

Groups	pH	NH <sub>3</sub> -N/TN	LA	AA	PA	BA	Yeast	Mold	CO <sub>2</sub>
Control	5,46 <sup>a</sup>	28,33 <sup>a</sup>	3,33 <sup>e</sup>	8,46 <sup>a</sup>	0,72 <sup>a</sup>	6,46 <sup>a</sup>	3,15 <sup>a</sup>	5,70 <sup>a</sup>	2,51 <sup>a</sup>
1%wafer waste	5,25 <sup>a</sup>	16,83 <sup>b</sup>	4,59 <sup>d</sup>	5,75 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	3,95 <sup>b</sup>	1,90 <sup>b</sup>	1,48 <sup>b</sup>	2,41 <sup>b</sup>
2% wafer waste	4,43 <sup>b</sup>	12,68 <sup>c</sup>	8,67 <sup>c</sup>	4,89 <sup>c</sup>	0,00 <sup>b</sup>	1,42 <sup>c</sup>	1,70 <sup>c</sup>	1,48 <sup>b</sup>	2,05 <sup>c</sup>
4% wafer waste	4,16 <sup>bc</sup>	11,38 <sup>cd</sup>	13,20 <sup>b</sup>	4,15 <sup>d</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>d</sup>	1,01 <sup>d</sup>	1,01 <sup>c</sup>	1,66 <sup>d</sup>
6% wafer waste	3,95 <sup>c</sup>	9,14 <sup>d</sup>	13,59 <sup>a</sup>	4,04 <sup>e</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>d</sup>	1,01 <sup>d</sup>	0,00 <sup>d</sup>	1,45 <sup>e</sup>
SEM	,147	1,593	,973	,372	,066	,575	,180	,450	,094
P	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>

<sup>a,b,c,d,e</sup>: Values with different letters in the same column were found to be different (P<0.05), **NH<sub>3</sub>-N/TN:** Ammonia nitrogen, **CO<sub>2</sub>:** Carbon dioxide g/kg DM, **LA:** Lactic acid g/kg DM, **AA:** Acetic acid g/kg DM, **PA:** Probiotic acid g/kg DM, **BA:** Butyric acid g/kg DM, **Yeast:**log10/cfu/gr, **Mold:**log10/cfu/gr.

**Table 4.** Correlation between yeast and mold values and fermentation characteristics of alfalfa silages prepared by adding different ratios of wafer waste.

		NH <sub>3</sub> -N	pH	LA	AA	PA	BA	Yeast	Mold	CO <sub>2</sub>	IVOMD	ME	CH <sub>4</sub>
NH <sub>3</sub> -N	PC	1	,855**	-,844**	,976**	,910**	,944**	,957**	,957**	,823**	-,798**	-,801**	-,779**
	P		,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
pH	PC		1	-,917**	,843**	,633**	,910**	,845**	,750**	,909**	-,865**	-,868**	-,857**
	P			,000	,000	,003	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
LA	PC			1	-,875**	-,629**	-,954**	-,906**	-,769**	-,988**	,916**	,919**	,821**
	P				,000	,003	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
AA	PC				1	,926**	,972**	,989**	,969**	,849**	-,835**	-,838**	-,783**
	P					,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
PA	PC					1	,817**	,889**	,961**	,596**	-,631**	-,634**	-,613**
	P						,000	,000	,000	,006	,003	,003	,004
BA	PC						1	,969**	,893**	,928**	-,895**	-,898**	-,836**
	P							,000	,000	,000	,000	,000	,000
Yeast	PC							1	,955**	,883**	-,862**	-,866**	-,773**
	P								,000	,000	,000	,000	,000
Mold	PC								1	,763**	-,740**	-,743**	-,703**
	P									,000	,000	,000	,001
CO <sub>2</sub>	PC									1	-,892**	-,895**	-,803**
	P										,000	,000	,000
IVOMD	PC										1	1,000**	,914**
	P											,000	,000
ME	PC											1	,913**
	P												,000
CH <sub>4</sub>	PC												1

PC: Pearson correlation, \*: Correlation is significant at 0.05 level, \*\*: Correlation is significant at 0.01 level, **NH<sub>3</sub>-N/TN**: Ammonia nitrogen, **CO<sub>2</sub>**: Carbon dioxide g/kg DM, **LA**: Lactic acid g/kg DM, **AA**: Acetic acid g/kg DM, **PA**: Probiotic acid g/kg DM, **BA**: Butyric acid g/kg DM, **IVOMD**: *In vitro* organic matter digestion %, **ME**: Metabolizable energy, **CH<sub>4</sub>**: *In vitro* methane gas (%).

Compared to the control group, a decline in the CP values of the silages was seen when the wafer waste was added. This decrease was due to the low CP content of wafer waste. When the silages' NDF and ADF values were investigated, a decline in ADF and NDF values was seen that correlated with wafer waste's addition. In this study, the difference in ADF and NDF values between the control and test groups is thought to be due to wafer waste's low ADF and NDF content. ADF content is an important criterion that gives information about the degree of digestion of rough forages. In the present study, it was determined that the addition of wafer waste significantly decreased the ADF content of alfalfa silage. The digestibility of forages with low ADF content is also high. Increases were seen in all test groups as opposed to the control group when the silages' IVOMD and ME values were investigated, and the addition of 6% wafer waste resulted in the silages' highest IVOMD value (64.30) and ME value (9.56). It is thought that LA is the main fermentation product in silages, and LA is fermented in the rumen and utilized by ruminants and accordingly increases IVOMD and ME values (Okuyucu et al., 2018). When Table 4 is examined, it is seen that there is a positive correlation between LA and IVOMD (R: 0.916) and LA and ME (R: 0.919).

A rise was seen in all trial groups compared to the control group when the silages' *in vitro* CH<sub>4</sub> values were tested, with the addition of a 6% wafer producing the highest result. With the addition of 6% wafer waste, an increase in *in vitro* CH<sub>4</sub> values was observed in parallel with the increase in IVOMD degree. When Table 4 is examined, the observation of (R:0,914) between IVOMD and *in vitro* CH<sub>4</sub> supports this statement. In the research by Acar and Bostan (2016) in which sugar beet molasses, barley paste, and whey powder (0, 50mg/kg, and 100mg/kg DM) were used as alfalfa silage additives, it was found that while the additives generally decreased the CP, NDF, ADF content of silage, they increased the digestible dry matter and dry matter consumption. It was found that while the amounts of acetic acid and butyric acid decreased in silages, the amount of lactic acid increased. Similarly, Şakalar and Kamalak (2016) reported that while molassed dry sugar beet pulp increased the IVOMD and ME value of alfalfa silage, it decreased the CA, CP, ADF, ammonia amount and pH of alfalfa silage in a study in which they added molassed dry sugar beet pulp at the ratios of 0%, 1.5, 3.0, 4.5 and 6.0% to alfalfa harvested during the flowering period.

In this study, when the fermentation characteristics (pH, NH<sub>3</sub>-N, LA, AA, PA, BA, yeast, mold, CO<sub>2</sub>) of alfalfa silages prepared by adding wafer waste at different ratios were examined, the differences between the groups were found to be significant (P<0.05). When the pH levels of the silages were measured, the control group had the highest pH value (5.46), while the group that had added 6% wafer waste had the lowest pH value (3.95) (P<0.05). As the water-soluble carbohydrate content of the silage material increases, the ideal acidic environment required for obtaining quality silage is formed. Therefore, the silage pH is expected to decrease with the addition of wafer waste to alfalfa silage. The lower pH values in the groups to which wafer waste was added compared to the control group were attributed to the tolerance of the low water-soluble carbohydrate content of alfalfa plant with wafer waste and the increase in lactic acid values due to the addition of wafer waste. When the correlation table (table 4) of the silages obtained in this study was examined, it was observed that there was a negative correlation (R: -,917) between pH and LA. Silage pH indicates silage acidity and, therefore, the degree of fermentation. Lower pH is preferred for quality silage. Yakışır (2018) reported that adding different levels of molasses dry sugar beet pulp to alfalfa silage decreased the pH value of alfalfa and increased the lactic acid value. This statement conforms with the present study.

When the NH<sub>3</sub>-N/TN values of the silages made in this study were compared, the control group had the greatest NH<sub>3</sub>-N/TN value (28.33%) and the group with 6% wafer waste addition had the lowest NH<sub>3</sub>-N/TN value (9.14%), with a decrease being shown because of the addition of wafer waste (P<0.05). In poorly preserved silages, the protein fraction is largely degraded; therefore, high ammonia-N (% of total nitrogen) indicates poor fermentation. Levels <10% of total nitrogen indicate good fermentation (Yakışır, 2018). This decrease in silage NH<sub>3</sub>-N/TN values is thought to be because easily soluble carbohydrate sources have a good impact on silage fermentation and reduce proteolysis (Bingöl et al., 2009; de Oliveira et al., 2021). Chen et al. (2020) and Yakışır and Aksu (2019) reported that the usage of additives with easily soluble carbohydrate content as additives in making silage from alfalfa plant creates a good fermentation environment for lactic acid bacteria and that microorganisms can multiply rapidly and minimize protein degradation by lowering the pH of the environment. When the correlation table was examined, the negative correlation between LA and NH<sub>3</sub>-N/TN (R: - 0,844) and the positive correlation between pH and NH<sub>3</sub>-N/TN (R: 0,855) supported this statement.

When the LA values of the silages obtained from this study were examined, an increase was observed in all test groups in comparison to the control group, and the highest LA value (13.59 g/kg DM) was determined in the group with 6% wafer waste addition (P<0.05). Gao et al. (2021) reported an increase in LA values due to the addition of molasses and fructose to alfalfa silage, and this statement is in conformity with the present study. In a study (Canbolat et al., 2013), in which Galician fruit rich in tannin and carbohydrate content was used as a silage additive, it was reported that the LA

amount of alfalfa silage increased. When the silages' AA values were tested, all trial groups showed a decline compared to the control group, and the lowest AA value (4.04 g/kg DM) occurred due to the addition of 6% wafer waste. The decrease in acetic acid in silages can be considered an advantage in increasing silage consumption in ruminants fed mainly on silage (Kamalak et al., 2012). While PA in silages was detected in the control group, it was not found due to the addition of wafer waste (P<0.05). BA values showed a decreasing trend depending on the addition of wafer waste, but it was not detected in the groups to which 4% and 6% wafer waste was added (P<0.05). Acetic acid and butyric acid are undesirable because they deteriorate the quality of silage (Cheng et al., 2022; Wang et al., 2021). Acar and Bostan (2016) reported that the usage of sugar beet molasses, barley paste, and whey powder as alfalfa silage additives decreased the amount of acetic acid as well as butyric acid and increased the amount of lactic acid in silages, and this statement is in conformity with the present study. In this study, when the yeast and mold values (Table 3) of the silages prepared with the addition of wafer waste at different ratios to alfalfa plants were examined, a decrease was observed because of the rise in wafer waste in comparison to the control group. It was reported that silage pH values decreased due to LA conversion of easily soluble carbohydrate sources and prevented yeast and mold growth in silage. In the study, on the 5th day of aerobic stability, the CO<sub>2</sub> production amounts of the silage groups varied between (1.45-2.52 g/kg DM), and a decrease was observed in all test groups due to the increase in wafer waste compared to the control group (P<0.05). It was determined that the lowest yeast mold amount and CO<sub>2</sub> ratio level and the highest LA value in the groups with 6% wafer waste addition decreased the pH value in the silages in the groups with additive and accordingly prevented the growth and activity of yeast and molds and had an improving effect on aerobic stability values. When the correlation table was examined, the negative correlation between LA and CO<sub>2</sub> (R: -,988), negative correlation between LA and yeast (R: -,906), and negative correlation between LA and mold (R: -,769) support this statement.

When the results obtained in this study were evaluated, it was concluded that alfalfa silages prepared with the addition of wafer waste had improved the quality of the silage, fermentation properties, and *in vitro* organic matter digestion, could be used as silage additives and the best results were obtained with the addition of wafer waste at 6% level.

### Conflict of Interest

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

### Ethical Approval

This study (in accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees" with the decision of Harran

University Animal Experiments Local Ethics Committee (HRU-HADYEK) 2022/006/11 dated 07/09/2022 and numbered 161607) not subject to permission.

## Similarity Rate

We declare that the similarity rate of the article is 13% as stated in the report uploaded to the system.

## Author Contributions

Motivation / Concept: SSA

Design: SSA

Control/Supervision: SSA

Data Collection and / or Processing: SSA

Analysis and / or Interpretation: SSA

Literature Review: SSA

Writing the Article: SSA

Critical Review: SSA

## References

- Acar Z, Bostan M, 2016: The effects of some natural additives on quality of alfalfa silage. *Anadolu J Agr Sci*, 31 (3), 433-440.
- AOAC (1990). Official methods of analysis, Association of official analytical chemists, Washington DC.
- Ashbell G, Weinberg ZG, Azrieli A, Hen Y, Horev B, 1991: A simple system to study the aerobic determination of silages. *Can Agric Eng*, 34, 171-175.
- Bingöl NT, Bolat D, Karsli MA, Akça İ, 2009: Arpa hasılı ve korunga karışımı silaja farklı düzeylerde melas ilavesinin silaj kalitesi ve sindirilebilirliği üzerine etkileri. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg*, 4 (1), 23-30.
- Broderick GA, Kang JH, 1980: Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *J Dairy Sci*, 63 (1), 64-75.
- Canbolat Ö, Yıldırım HK, Filya İ, 2013: Yonca silajlarında katkı maddesi olarak gladiçya meyvelerinin (*Gleditsia Triacanthos*) kullanılması olanakları. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 19 (2), 291-297.
- Chen L, Qu H, Bai S, Yan L, You M, Gou W, ... & Gao F, 2020: Effect of wet sea buckthorn pomace utilized as an additive on silage fermentation profile and bacterial community composition of alfalfa. *Bioresour Technol*, 314, 123773.
- Cheng Q, Chen L, Chen Y, Li P, & Chen C, 2022: Effects of LAB inoculants on the fermentation quality, chemical composition, and bacterial community of oat silage on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Microorganisms*, 10 (4), 787.
- Denek N, Can A, Avci M, Aksu T, Durmaz H, 2011: The effect of molasses-based pre-fermented juice on the fermentation quality of first-cut lucerne silage. *Grass Forage Sci*, 66 (2), 243-250.
- de Oliveira NC, de Pinho Costa KA, Rodrigues LG, Silva ACG, Costa JVCP, Silva SÁA, ... & de Lima Vieira M, 2021: Fermentation characteristics and nutritive value of sweet sorghum silage with Paiguas palisadegrass and Ipyora grass. *Semina: Ciências Agrárias*, 42 (3Supl1), 1923-1940.
- Filya İ, Ashbell G, Hen Y, Weinberg ZG, 2000: The effect of bacterial inoculants on the fermentation and aerobic stability of whole crop wheat silage. *Anim Feed Sci Technol*, 88 (1-2), 39-46.
- Gao R, Wang B, Jia T, Luo Y, Yu Z, 2021: Effects of different carbohydrate sources on alfalfa silage quality at different ensiling days. *Agriculture*, 11 (1), 58.
- Kamalak A, Özoğul F, Çalışlar S, Canbolat Ö, 2012: Silaj katkı maddesi olarak tanen ekstratinın (Artutan) yonca silajının kalite özellikleri ile koyunlarda yem tüketimi sindirim derecesi ve rumen fermantasyonu üzerine etkisi. Tubitak Project Number: 1100397.
- Karabulut A, Filya İ, 2007: Yemler bilgisi ve yem teknolojisi. 4th ed., *Uludağ Üniv Zir Fak Ders Notları*, Bursa, Türkiye.
- Ke WC, Ding WR, Xu DM, Ding LM, Zhang P, Li FD, Guo XS, 2017: Effects of addition of malic or citric acids on fermentation quality and chemical characteristics of alfalfa silage. *J Dairy Sci*, 100 (11), 8958-8966.
- Koç F, Aksoy SO, Okur AA, Celikyurt G, Korucu D, Ozduven ML, 2017: Effect of pre-fermented juice, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri* on the fermentation characteristics and aerobic stability of high dry matter alfalfa bale silage. *J Anim Plant Sci*, 27 (6), 1766-1773.
- König W 2020: Effects of ensilability traits of forage legumes and additives on silage quality assessed by fermentation pattern and qPCR quantification of clostridia. Doctoral Dissertation, Doctoral School in Environmental, Food and Biological Sciences, Helsinki.
- McDonald P, Henderson AR, Heron SJE, 1991: The biochemistry of silage. 2nd ed., Chalcombe Publ., Edinburgh, UK.
- Menke KH, Steingass H, 1988: Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev*, 28, 7-55.
- Okuyucu B, Özdüven ML, Koç F, 2018: Farklı Düzeylerde Laktik Asit Bakterileri ile Enzim İlavésinin Yaş Bira Posası Silajlarında Fermantasyon, Aerobik Stabilité ve in vitro Sindirim Üzerine Etkileri. *Alinteri J Agric Sci*, 33 (2), 145-151.
- Playne MJ, McDonald P, 1966: The buffering constituents of herbage and of silage. *J Sci Food Agric*, 17 (6), 264-268.
- SPSS Inc, 1991: *SPSS statistical algorithms*. SPSS Incorporated.
- Suzuki M, Lund CW, 1980: Improved gas-liquid chromatography for simultaneous determination of volatile fatty acids and lactic acid in silage. *J Agric Food Chem*, 28 (5), 1040-1041.
- Şakalar B, Kamalak A, 2016: Melaslı kuru şeker pancarı posasının yonca bitkisinin silolanmasında kullanılması. *Anadolu J Agr Sci*, 31 (1), 157-164.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA, 1991: Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*, 74, 3583-3597.
- Wang M, Gao R, Franco M, Hannaway DB, Ke W, Ding Z, ... & Guo X, 2021: Effect of mixing alfalfa with whole-plant corn in different proportions on fermentation characteristics and bacterial community of silage. *Agriculture*, 11 (2), 174.
- Yakışır BÖ, 2018: Farklı seviyelerde melaslı kuru şeker pancarı posası ilavesinin yonca silajı kalitesi üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Van YYÜ Sag Bil Enst, Van.
- Yakışır BÖ, Aksu T, 2019: The effect of different levels of molasses's dried sugar beet pulp on the quality of alfalfa silage. *Van Vet J*, 30 (2), 71-76.



## Calgary-Cambridge Kılavuzlarında yer alan becerilerin özerklik ilkesi kapsamında değerlendirilmesi

Aytaç ÜNSAL ADACA<sup>1,a,\*</sup>

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

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-4958-2350

Geliş Tarihi: 23.02.2023

Kabul Tarihi: 04.05.2023

**Bu makale Nasıl kaynak gösterilir:** Ünsal Adaca A. (2023).

Calgary-Cambridge Kılavuzlarında yer alan becerilerin özerklik ilkesi kapsamında değerlendirilmesi. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 47-52, DOI:10.31196/huvfd.1255647.

**\*Yazışma adresi:** Aytaç ÜNSAL ADACA

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

e-mail: aytacunsal@ankara.edu.tr

Online erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Özet:** Calgary-Cambridge Kılavuzları, sağlık bilimleri alanında çeşitli disiplinlerde hekim-hasta iletişimini geliştirmek üzere kurgulanmıştır. Bu kılavuzlar, veteriner hekimliğe 2000 yılında uyarlanmış, birçok değişikliğin ardından güncel halini 2017 yılında almıştır. Çalışmada, Türkçeye adaptasyonu yapılan kılavuzlardaki 73 maddenin, sağlık alanındaki temel etik ilkelerden özerkliğe saygı ilkesi ile uyumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Nitel araştırma olarak tasarlanan bu çalışmada, 73 beceriden 47'sinin özerklik ilkesiyle doğrudan ilişkilendirilebileceği tespit edilmiştir. İnceleme sonucunda, hasta sahibine saygı duyma (n=15), hasta hakkında bilgi verme (n=13), hasta sahibinin verilen bilgiyi anladığını kontrol etme (n=6), hasta sahibiyle birlikte ortak karar verme (n=12) ve hasta sahibinin onamını alma (n=1) temalarında sınıflandırılabilir becerilerin, özerkliğe saygı ilkesi açısından veteriner fakültesi öğrencilerinde ve veteriner hekimlerde farkındalık yaratabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, iletişim becerilerini geliştirmek üzere kurgulanan Calgary-Cambridge Kılavuzlarının sağlık bilimlerinde temel etik ilkelerden biri olan özerkliğe saygı ilkesiyle uyumlu olduğu söylenebilir. Bu nedenle bahsi geçen kılavuzların veteriner hekimliği lisans müfredatına dahil edilmesiyle öğrencilerin iletişim becerilerinin yanı sıra, etik karar verme becerilerinin de geliştirebileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Aydınlatılmış onam, Calgary-Cambridge Kılavuzları, Uygulamalı etik, Özerklik, Veteriner hekimliği.

### Evaluation of the skills in the Calgary-Cambridge Guides within the scope of autonomy

**Abstract:** The Calgary-Cambridge Guidelines have been designed to improve physician-patient communication in various disciplines in the field of health sciences. These guidelines were adapted to veterinary medicine in 2000 and were updated in 2017 after many changes. The study aimed to evaluate the compatibility of 73 items in the guidelines adapted into Turkish with the principle of respect for autonomy, one of the fundamental ethical principles in the field of health sciences. This study, designed as qualitative research, determined that 47 out of 73 skills could be directly associated with the principle of autonomy. As a result, it is thought that the skills that can be classified in the themes of demonstrating respect to the client (n=15), providing information about the patient (n=13), checking the client's understanding of the information given (n=6), shared decision making with clients (n=12), and obtaining consent (n=1) can create awareness in students and vets in terms of autonomy. Consequently, it can be said that the Calgary-Cambridge Guidelines, designed to develop communication skills, are compatible with respect for autonomy, which is one of the basic ethical principles in health sciences. In this way, it is thought that by including the guides mentioned above in the veterinary undergraduate curriculum, students' ethical decision-making skills can be improved, as well as their communication skills.

**Keywords:** Autonomy, Calgary-Cambridge Guides, Applied ethics, Informed consent, Veterinary medicine.

## Giriş

Literatürde ilk kez 1996 yılında yer alan Calgary-Cambridge Kılavuzları (CCK) (Kurtz ve Silverman, 1996), sağlık bilimlerindeki çeşitli alanlarda iletişim ve konsültasyon becerilerinin geliştirilmesine katkı sunmaktadır (Baniaghil ve ark., 2022; Englar ve ark., 2016; Eskandari ve ark., 2021; Greenhill ve ark., 2011; Sommer ve ark. 2016). Veteriner hekimliği alanına 2000 yılında uyarlanan bu kılavuzlar günümüze kadar birçok kez yeniden yapılandırılmıştır (Adams ve Kurtz, 2017). Bahsi geçen kılavuzların, 2017’de yayımlanan versiyonu (Adams ve Kurtz, 2017) temel alınarak Türkçeye uyarlanan CCK’de, -İngilizce orijinaline uygun olarak Oturumu Başlatma, Bilgi Toplama, Görüşmenin Yapılandırılması, İlişki Kurma, Oturumu Sonlandırma, Açıklama ve Planlama Seçenekleri olmak üzere yedi ana başlık ve bu başlıklar içerisinde toplam 73 beceri maddesi yer almaktadır. Bu becerilerin bazıları iletişim becerilerine, bir kısmı da klinik karar verme ve etik karar verme becerilerine yönelik olarak tasarlanmıştır (Ünsal Adaca, 2023).

İlk kez Beauchamp ve Childress tarafından ortaya atılan ve sağlık alanında temel etik ilkeler olarak kabul gören dört temel etik ilke (yararlılık, zararsızlık, özerkliğe saygı ve adalet) veteriner hekimliği etiğinin de temel konuları arasında yer almaktadır. Beauchamp ve Childress, özerkliğe saygı ilkesini özerk seçimler yapabilme yetisi, aydınlatılmış onam, bilgilerin paylaşımı, anlama ve özgür irade başlıklarında detaylandırmıştır (Temel, 2017).

Sağlık bilimlerinin diğer branşlarında olduğu gibi veteriner hekimliğinde de aydınlatılmış onam (bilgilendirilmiş onam) konusu önemli bir yere sahiptir (Ashall ve ark., 2018); ancak tıp hekimliğinden farklı olarak, veteriner hekimliği mesleğinde, hastanın özerkliği yerine hasta sahibinin özerkliğinden bahsedilmektedir. Bu bağlamda hasta yerine hasta sahibinin (hayvan sahibi) bilgilendirilmesi ve hastası ile ilgili kararlarda kişinin rızasının alınması söz konusu olmaktadır (Özen, 2005).

Calgary Cambridge Kılavuzlarının ana fikirlerinden biri, hasta sahibinin duygu ve düşüncelerine önem verilmesi, hasta sahibinin hastalık hakkında ayrıntılı bilgi sahibi olması, veteriner hekimin tüm tedavi seçeneklerini hasta sahibine sunması ve hasta sahibinin kararına saygı duyması gerektiğidir. Hasta sahibinin bilgilendirilmesi ve hayvanı hakkında özgür karar verebilmesi ise sağlık bilimlerinde temel etik ilkelerden biri olan özerklik ilkesiyle birebir örtüşmektedir. Bu nedenle yapılan bu çalışmada, veteriner hekimliği faaliyetleri sırasında veteriner hekimlerin hasta sahipleriyle ilişkilerinde doğru ve etkili iletişim kurabilmeleri için yol gösterici olarak hazırlanan Calgary-Cambridge Kılavuzlarının, veteriner hekimliği etiğinin özerkliğe saygı ilkesi çerçevesinde incelenmesi ve CCK ile bahsi geçen ilkenin uyumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Araştırmaya başlamadan önce ADDIE modeline göre eğitim ihtiyaçlarının analizi (McGriff, 2000) yapılmış, veteriner

hekimliği etiği eğitiminde kullanılmak üzere özerkliğe saygı ilkesi ile ilgili temel kod, kılavuz veya ilkeler taranmıştır. Yerlikaya ve Özen’in (2001) veteriner hekimliği eğitiminde Türkçeleştirme özelinde yaptıkları bir çalışmadan yola çıkılarak, bu çalışmanın ana materyalinin CCK’nin orijinali yerine Türkçe uyarlaması (Ünsal Adaca, 2023) olması tercih edilmiştir.

Kılavuzlardaki her bir beceri maddesi, sağlık alanında temel etik ilkeler arasında yer alan özerkliğe saygı ilkesi çerçevesinde incelenmiştir. Yapılan nitel içerik değerlendirmesi sonucunda, her bir beceri özerkliğe saygı ilkesi çerçevesinde belirlenen temalar ile ilişkilendirilmiştir. Bu kapsamda, özerkliğe saygı ilkesinin basamakları olarak değerlendirilebilecek i. hasta sahibine saygı duyma, ii. hasta sahibini bilgilendirme, iii. verilen bilginin anlaşıldığının kontrolü ve iv. ortak karar verme ve rıza gösterme olmak üzere dört tema oluşturulmuştur. Bazı becerilerin birden fazla temayı temsil etmesi durumunda, o becerinin ağırlıklı olarak daha yatkın olduğu temada gösterilmesi tercih edilmiştir. Seçilen bu temalara uygun olan CCK maddeleri, orijinaline sadık kalınarak tablolar halinde verilmiştir. Tablolarda verilen “Madde” ve “Beceri tanımı” sütunları, CCK’nın Türkçeye uyarlaması yapılan çalışmadaki beceri sıraları ve tanımlarına uygun olarak alıntılanmıştır.

Çalışmada herhangi bir insan/hayvan denek kullanılmadığından ve/veya retrospektif yöntem ile veri analizi yapılmadığından Etik Kurula başvurulma ihtiyacı bulunmamaktadır. Çalışmanın tasarlanmasından raporlanması aşamasına kadar araştırma ve yayın etiği ilkelerine uyulmuştur.

## Bulgular

Araştırma kapsamında CCK’de yer alan 73 maddelik beceri listesinin 47’sinin veteriner hekimliği alanında temel etik ilkeler arasında kabul edilen özerkliğe saygı ilkesiyle doğrudan bağlantılı olduğu kanaatine varılmıştır. Geriye kalan maddelerin çoğunun da yine dolaylı olarak etik ilkelerle özdeşleştirilebileceği görülmüştür. Doğrudan bağlantılı olduğu düşünülen maddeler incelenmiş ve dört ayrı tabloda verilmiştir.

Tablo 1’de özerkliğe saygı ilkesi çerçevesinde; bir veteriner hekimin hasta sahibinin kişiliği, duyguları ve düşüncelerine saygı duyması ile ilgili maddeler verilmiştir. Tablo 2’de, bir veteriner hekimin, hayvan ile ilgili kararları özgür iradesiyle verebilmesi için hasta sahibini bilgilendirilmesi ile ilgili maddeler gösterilmiştir. Tablo 3’te veteriner hekimin vermiş olduğu bilginin hasta sahibi tarafından anlaşıldığının kontrolüne ilişkin beceri maddeleri yer almıştır.

Son tabloyu (Tablo 4) ise veteriner hekim ile hasta sahibinin hayvan ile ilgili herhangi bir karara ortak katılımı ve yapılacak teşhis, tedavi ve diğer uygulamalar için hasta sahibinin bilgilendirildikten sonra özgür iradesi ile rıza göstermesi ile ilgili maddeler oluşturmuştur.

## Tartışma ve Sonuç

Veteriner hekimliği mesleği, özerkliğin kime verildiği konusunda beşerî hekimlikten kesin çizgilerle ayrılmaktadır (Hiestand, 2022). Buna rağmen literatürde, özerklik ve onam verme konusunda veteriner hekimliğin, beşerî hekimliğin bir

branşı olan pediatri ile benzerliği de vurgulanmıştır (Gray, 2020). Genel anlamda veteriner hekimliğinde, beşerî hekimlikten farklı olarak, hasta ve hekim ikilisine “hasta sahibi” sıfatıyla farklı bir üçüncü bileşen dahil olmakta ve özerklik konusu hasta sahibi (üçüncü kişi) özelinde işlenmektedir (Hiestand, 2022).

**Tablo 1.** Hasta sahibine saygı duyma ile ilgili beceriler.

Madde	Beceri tanımı
5	Hasta sahibine ilgi ve saygı gösterir; hastanın ve hasta sahibinin fiziksel olarak rahat olduğundan emin olur.
9	Hem hasta sahibinin hem de kendisinin görüşlerini dikkate alarak daha önceden belirlenen gündemi tartışır.
19	Aşağıdaki maddeleri belirler ve uygun şekilde araştırır: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hasta sahibinin görüşleri (nedene ilişkin inançları)</li> <li>Hasta sahibinin her bir probleme ilişkin endişeleri (kaygıları)</li> <li>Hasta sahibinin beklentileri (hedefler, hasta sahibinin beklediği yardım, maliyetle ilgili konular, aciliyet)</li> <li>Mevcut durumun hasta sahibi ve hayvanın hayatı üzerindeki etkileri</li> <li>Hasta sahibi, hayvan ve diğer kişiler arasındaki ilişki</li> </ul>
20	Hasta sahibini duygularını ifade etmeye teşvik eder.
28	Hasta sahibinin düşünce ve duygularına değer verir; yargılayıcı değildir.
29	Hasta sahibinin durumunu veya duygularını anladığını ve göz önünde tuttuğunu dile getirirken empati kurar; hasta sahibinin görüşlerini ve duygularını açıkça kabul eder.
45	Açıklamaları hasta sahibinin bakış açısıyla (daha önce ortaya çıkan inanışlar, endişeler ve beklentiler ile) ilişkilendirir
46	Hasta sahibini sorular sorması, açıklama talebinde bulunması veya kaygılarını ifade etmesi, uygun şekilde karşılıklar vermesi için cesaretlendirir.
48	Verilen bilgiler, kararlar ve kullanılan terimler doğrultusunda hasta sahibinin duygularını, tepkilerini ve kanaatlerini öğrenir; kabul eder ve gerektiğinde bunlara değinir.
62	Hasta sahibinin kanaatlerini, tepkilerini ve kaygılarını öğrenir (Örneğin; eğer görüş; duygularla, kabul edilebilirlikle ve hasta sahibinin düşünceleri ile eşleşiyorsa).
65	Hasta sahibinin motivasyon, yararlar, engeller, harekete geçme zorunluluğu konularındaki görüşlerini alır; gerektiğinde alternatif bakış açısını kabul eder ve savunur.
66	Hasta sahibinin görüşlerini kabul eder; gerektiğinde alternatif bakış açısını savunur.
67	Hasta sahibinin kabul edilebilirliği de dahil olmak üzere, planlar ve tedaviler konusundaki kavrayışını, kaygılarını ve tepkilerini ortaya çıkarır.
68	Hasta sahibinin yaşam tarzını, inançlarını, kültürel geçmişini ve neyi yapıp neyi yapamayacağını dikkate alır.
73	Hasta sahibinin muhtemel endişeleri veya olumsuz bir sonuçla ilgili sorularını ve düşüncelerini ifade etmesini teşvik eder.

**Tablo 2.** Hasta sahibini bilgilendirme becerileri.

Madde	Beceri tanımı
33	Fiziksel muayenenin birbiri ile bağlantısız gibi görünen aşamalarının veya hasta sahibine ilgisiz gibi görünebilecek sorularının gerekçelerini açıklar.
34	Fiziksel muayene yaparken süreci ve bulguları açıklar.
36	Hasta sahibinin başlangıç noktasını değerlendirir: bilgi vermeden önce hasta sahibinin önceki bilgisini sorgular; hasta sahibinin ne kadar bilgi almak istediğini öğrenir.
37	Başka hangi bilgilerin hasta sahibine yardımcı olabileceğini sorar (Örneğin; etiyoloji, prognoz).
38	Açıklamalarını uygun zamanlarda yapar. Vaktinden önce herhangi bir tavsiye, bilgi veya güvence vermekten kaçınır
41	Bilgiyi pekiştirmek için tekrar eder ve özetler.
42	Kısa, kolay anlaşılır bir dil kullanır, teknik terimlerden kaçınır veya kullandığı terimi açıklar
43	Bilgiyi aktarmak için görsel yöntemler kullanır: diyagramlar, modeller, yazılı bilgiler ve talimatlar vb.
61	Problemin nedenlerini, durumun ciddiyetini, beklenen sonuçları, kısa ve uzun vadeli sonuçları açıklar.
63	Seçenekleri tartışır (Örneğin; herhangi bir şey yapılmaması, araştırma, ilaç tedavisi, ilaç dışı tedaviler, sıvı takviyeleri, ameliyat, davranış muayenesi, önleyici tedbirler, ötanazi).
64	Sunulan plan veya tedavi hakkında bilgi verir: <ul style="list-style-type: none"> <li>Adı</li> <li>Basamakları ve nasıl etki ettiği</li> <li>Faydalar ve avantajlar</li> <li>Olası yan etkiler ve riskler</li> </ul>
71	Hasta sahibinin neler yaşayabileceği ve sonuçlar hakkında nasıl bilgilendirileceği dahil olmak üzere işlemler hakkında açık bilgi sağlar.
72	İşlemi tedavi planıyla ilişkilendirir, değerini ve amacını ortaya koyar.

**Tablo 3.** Verilen bilginin anlaşılabilirliği.

Madde	Beceri tanımı
8	Hasta tarafından anlatılan problemleri eksiksiz bir şekilde anladığından emin olur. Hastanın başka sorunlarının olup olmadığını sorgular (Örneğin, "Buraya aşı tekrarı için geldiniz ancak Max normalden daha yorgun görünüyor; görüşmek istediğiniz başka herhangi bir konu var mı? veya "Bugün benimle paylaşmak istediğiniz başka endişeleriniz var mı?").
16	Hasta sahibini doğru anladığını teyit etmek için verdiği bilgileri düzenli aralıklarla özetler, gerektiğinde hasta sahibini bilgiyi düzeltmeye veya daha fazla bilgi vermeye davet eder.
17	Kısa, kolay anlaşılır sorular sorar ve açıklamalar yapar; mesleki terimlerden kaçınır, gerekli durumlarda bu terimleri yeterince açıklar.
21	Belirli bir konuya (örneğin hastanın öyküsüne) ilişkin olarak yaptığı sorgulamanın sonunda, doğru anladığına ve hiçbir önemli veriyi kaçırmadığına emin olmak için, anladıklarını hasta sahibine özetler ve hasta sahibini bu bilgileri doğrulamaya davet eder.
35	Bilgi kümeleme ve anlaşılabilirlik kontrolü: Anlaşılabilir, kavranabilir kümeler halinde bilgiler verir. Bu bilgi kümelerinin anlaşılıp anlaşılmadığını kontrol eder. Hasta sahibinin yanıtını, görüşmeye nasıl devam etmesi gerektiği konusunda bir kılavuz olarak kullanır.
44	Hasta sahibinin verilen bilgiyi veya yapılan planları anlayıp anlamadığını kontrol eder (Örneğin, hasta sahibinden anlattıklarını kendi sözcükleriyle tekrar etmesini ister; gerektiğinde yeniden açıklar).

**Tablo 4.** Ortak karar verme ve onam alma.

Madde	Beceri tanımı
<i>Ortak karar verme</i>	
30	Hasta sahibine yardım etme isteğini, anlayışını, ilgisini ifade eder. Hasta sahibinin çabalarını ve uygun bakımı takdir ettiğini belirtir. Hasta sahibine iş birliği önerir.
32	Hasta sahibinin sürece katılımını teşvik etmek için düşüncesini hasta sahibiyile paylaşır (Örneğin, "Şu anda düşündüğüm şey...").
49	Fikirler, düşünce süreçleri ve ikilemler konusunda kendi düşüncelerini paylaşır.
50	Hasta sahibini sürece dahil eder: <ul style="list-style-type: none"> <li>Talimatlar vermek yerine öneriler ve seçenekler sunar.</li> <li>Hasta sahibini, kendi görüş ve önerileriyle katkıda bulunmaya teşvik eder.</li> </ul>
52	Hasta sahibinin karar verme sürecine hangi düzeyde katılmak istediğini tespit eder.
53	Karşılıklı olarak kabul edilebilir bir plan oluşturur: <ul style="list-style-type: none"> <li>Mevcut seçeneklerle ilgili olarak kendi bakış açısını veya tercihini belli eder.</li> <li>Hasta sahibinin tercihlerini saptar.</li> </ul>
54	Hasta sahibiyile birlikte, <ul style="list-style-type: none"> <li>Planların kabul edilip edilmediğini</li> <li>Kayıpların ele alınıp alınmadığını kontrol eder.</li> </ul>
55	Hasta sahibi ve veteriner hekim açısından izlenecek adımlara ilişkin olarak hasta sahibi ile anlaşmaya varır.
56	Olası beklenmeyen sonuçları, plan işe yaramazsa ne yapılacağını ne zaman ve nasıl yardım isteneceğini açıklayarak bir güvenlik ağı oluşturur.
58	Hasta sahibinin planı kabul edip etmediğine ve plandan memnun olup olmadığına dair son kontrolleri yapar ve herhangi bir düzeltme, soru veya görüşülecek başka konuların olup olmadığını sorar.
69	Hasta sahibini planların uygulanmasına dahil olmaya ve planı takip etmeye teşvik eder.
70	Hasta sahibinin çevresinden alabileceği desteği sorgular, diğer seçenekleri görüşür.
<i>Onam alma</i>	
4	Kendini tanıtır, ziyaretin içeriğini açıklar ve rolünü belirtir; gerekirse hasta sahibinin onamını alır.

Veteriner hekimliğinde hasta sahibinin zihinsel olarak yeterli olduğu kabul edildiği takdirde; hayvanın genel sağlık durumu, teşhis ve tedavi seçenekleri ile ilgili bilgilerin hasta sahibine verilmesi gerektiği Türk veteriner hekimliği meslek etiği kodlarında da açıkça bildirilmiştir (Anonim, 2000). Bilgilendirilmiş onam alabilmek için kişinin zihinsel yeterlikte, kasıtlı eylem yapabilme kapasitesinde olması ve özgür olması gerekmektedir (Hiestand, 2022). Ancak, bu bildirim nasıl yapılması gerektiği, hasta sahibinin anlayıp anlamadığının değerlendirilmesinin (*hasta sahibini aydınlatma-bilgilendirme*) ve ardından hasta sahibinin verdiği kararı özgür iradesiyle verip vermediğinin kontrolünün (*hasta*

*sahibinin onamını alma*) nasıl yapılacağı konusunda henüz müstakil hazırlanmış ulusal düzeyde herhangi bir bilimsel çalışma, mevzuat düzenlemesi veya etik koda rastlanmamıştır. Bahsi geçen bilgilendirme ve onam alma konusunda tespit edilen olumsuz tutumların birçoğunun, iletişimde ve sürecin yönetiminde karşılaşılan birtakım hatalardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Meisel ve Kuczewski, 1996). Hatta, hasta sahibi onay verse bile tam anlatılmayan veya anlaşılmayan bilgilerden dolayı onamın geçersiz olabileceği literatürde bildirilmiştir (Ashall ve ark., 2017). Hasta sahibinin imzası bulunan bir onam formu, bir veteriner hekimin yasal olarak kendini korumasını



sağlamayabilir (Flemming ve Scott, 2004). Öte yandan, gerektiği gibi alınan bir onam, yalnızca hasta sahibini değil, aynı zamanda veteriner hekimleri de yasal açıdan koruyabilmektedir (Alat Er ve Aslım, 2021; Ashall ve ark., 2017; Flemming ve Scott, 2004). Dolayısıyla hem hasta sahibinin haklarını hem de veteriner hekimleri korumak adına doğru ve geçerli bir onam alma süreci için standart bir prosedüre ihtiyaç duyulduğu söylenebilir.

Bir görüşe göre (Flemming ve Scott, 2004), geçerli bir rızanın ancak hasta sahibinin durumu açık ve net bir şekilde anlamasına bağlı olduğu; anlaşılabilirliğin ise doğrudan etkili iletişim becerileriyle ilintili olduğu bilinmektedir. Özkul ve ark. (2008) tarafından Türkiye'deki veteriner hekimlerle yapılan bir çalışmada, veteriner hekim ile hasta sahibi arasında gerçekleşen görüşmenin etkili olabilmesinin iletişim becerilerine bağlı olduğu; özellikle açık ve anlaşılır bir dil kullanımının veteriner hekimlerin çoğunluğu tarafından tercih edildiği bildirilmiştir. Buna paralel olarak, hasta sahiplerinin veteriner hekimlerin mesleki jargon kullanımını asgari düzeye indirmeleri konusunda beklentileri olduğu da vurgulanmıştır (Özkul ve ark., 2008). Bu çalışmanın verileri değerlendirildiğinde, daha önce uluslararası alanda geçerlik ve güvenilirliği kanıtlanan, uzman görüşleri alınarak Türkçeye uyarlanma süreci tamamlanan CCK'nin çoğu maddesinin özerklik ilkesi ile bağdaştırılabildiği sonucuna varılabilir. Bu kılavuzlardan yararlanılarak ve probleme dayalı öğrenme modeli gibi kontrollü bir aktif öğrenme süreci yaşayarak (Kılınc, 2007), veteriner hekimlerin özerklik ilkesi ile ilgili temel basamakları deneyimleyebileceği düşünülmektedir. Türkiye'deki veteriner fakültelerinde görev yapan birçok akademisyenin probleme dayalı öğrenme yöntemini desteklemesi (Osmanagaoglu ve ark., 2011), öğrencilerin lisans eğitimlerinde özerkliğe saygı ile ilgili temel uygulamaları yapabilmelerine imkân tanıyabileceğini göstermektedir. Bu sayede, genel olarak teorik düzeyde verilen etik eğitimlerinin ekseninin uygulamalı etik (pratik etik) alanına doğru yönelebileceği söylenebilir.

Özerkliğe saygı ilkesinin ana konularından biri olan onam alma konusunda, bilgilendirme süreci ayrıntılı olarak değerlendirildiğinde; bilgi paylaşımı, seçeneklerin sunulması ve planlama yapılması, anlatılanların anlaşılması temaları göze çarpmaktadır. Son aşama olan rıza gösterilmesi basamağında ise seçenekler arasından uygun birine karar verme ve uygulama için izin verme adımları izlenmektedir (Temel, 2017). Bir çalışmada, hasta sahiplerinin veteriner hekimlerden beklentileri üç kategoride toplanmıştır. Bu kategorilerden ilki, veteriner hekimlerin hasta sahiplerini doğru anlaması, ikincisi hasta sahibine uygun şekilde bilgi verilmesi ve üçüncüsü ise hasta sahibinin hastası hakkında karar verme aşamasına katkı sunulmasıdır (Janke ve ark., 2021). CCK incelendiğinde Tablo 1, 2, 3 ve 4'te yer alan tüm becerilerin bu sürece hizmet ettiği sonucuna varılabilir. Tablo 4'te yalnız bir maddenin "onam" ifadesi taşıdığı tespit edilmesine rağmen, bu maddenin hasta sahibinden onam alma sürecinin tamamından bahsedildiği düşünülmektedir. Literatürde onamın yalnızca yazılı olarak değil, sözel olarak ve davranışlar aracılığıyla da verilebileceği yer almaktadır (Gray, 2020). Bu bağlamda, CCK'ye bütünsel olarak bakıldığında, aydınlatılmış onamın (bilgilendirilmiş onam)

tüm aşamalarına ayrıntılı olarak yer verildiği açıkça görülmektedir. Bu çalışma kapsamında hazırlanan Tablo 2, (hasta sahibini bilgilendirme becerileri) Tablo 3 (verilen bilginin anlaşılabilirliği) ve Tablo 4 (ortak karar verme ve onam alma) bu sürecin birtakım beceri kombinasyonlarından oluştuğunu göstermektedir. Tablo 1'de yer alan hasta sahibine saygı duyma temasının ise yalnızca bir basamak değil, veteriner hekim-hasta sahibi görüşmesinin tamamına hâkim olması istenen bir tutum ve davranış birleşimi olması gerektiği savunulmaktadır.

Beauchamp ve Childress tarafından ayrıntılandırılan özerkliğe saygı ve özerkliğe saygısızlığın (Temel, 2017); veteriner hekimliği hizmetlerinde sıklıkla karşılaşılabilecek etik problemler arasında yer alabileceği düşünülmektedir. Bu açıdan, CCK'de yer alan ve bulgular bölümünde tablolar halinde verilen becerilerin veteriner hekimlerin hasta sahibinin özerkliğine saygı duyma konusunda duyarlılığını arttırmasının yanı sıra, kişilerin özerkliğine saygısızlığını da köreltebilecek nitelikte olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak, veteriner hekimliğinde hastanın değil hasta sahibinin özerkliğinin olduğu görülmektedir. Hasta sahibinin özerkliğine saygı duyma, etik karar verme sürecinin önemli bileşenleri arasında yer aldığı söylenebilir. Bu sürecin basamakları, hasta sahibinin konu hakkında bilgilendirilmesi, bilgileri doğru anladığından emin olunması ve konu ile ilgili aklındaki tüm soru işaretlerinin aydınlatılması şeklinde sıralanabilir. Basamakların sonucunda ise hasta sahibinin veteriner hekimin sunduğu teşhis ve tedavi işlemleri hakkında bir karara varması (onam vermesi) gerektiği ortaya konmuştur. Bu sürecin sağlıklı yürütülebilmesinin hem iletişim becerileriyle hem de etik karar verme becerisiyle doğrudan ilintili olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda, iletişim becerilerini geliştirmek üzere kurgulanan Calgary-Cambridge Kılavuzlarının, veteriner fakültesi öğrencilerinde ve veteriner hekimlerde özerkliğe saygı ilkesi açısından farkındalık oluşturacağı düşünülmektedir. Bu nedenle bahsi geçen kılavuzların veteriner hekimliği lisans müfredatına dahil edilmesiyle öğrencilerin iletişim becerilerinin yanı sıra, etik karar verme becerilerinin de geliştirebileceği ileri sürülebilir. Ek olarak, veteriner hekimlerin mesleki faaliyetlerini özerklik ilkesi ile birlikte diğer temel etik ilkeler doğrultusunda gerçekleştirmelerinin teşvik edilmesi gerektiği ileri savunulabilir. Gelecek çalışmalarda, veteriner hekimliği uygulamalarında standardizasyonun sağlanması açısından, aydınlatılmış onam alma sürecinin, veteriner hekimliği mevzuatı ve meslek etiği boyutlarının yapılandırılması ve örnek onam metinlerinin oluşturulması önerilebilir.

## Çıkar çatışması

Bu çalışmada gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

## Etik izin

Bu çalışmada herhangi bir hayvan veya insan denek kullanılmamıştır. Çalışmada Araştırma ve Yayın Etiğine uyulduğunu beyan ederim.

## Finansal destek

Bu çalışma, hiçbir kişi, kurum veya kuruluş tarafından finansal olarak desteklenmemiştir.

## Benzerlik Oranı

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

## Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: AÜA

Tasarım: AÜA

Denetleme/Danışmanlık: AÜA

Veri Toplama ve/veya İşleme: AÜA

Analiz ve/veya Yorum: AÜA

Kaynak Taraması: AÜA

Makalenin Yazımı: AÜA

Eleştirel İnceleme: AÜA

## Kaynaklar

- Adams CL, Kurtz S, 2017: Skills for Communicating in Veterinary Medicine. 1st ed., Otmoor Publishing, New York, USA.
- Alat Er AD, Asım G, 2021: Veteriner hekimliğinde malpraktis. *Vet Farm Toks Dern Bult*, 12 (2), 89-104.
- Anonim, 2000: Veteriner hekimlik meslek etiği kuralları. *Dayanışma*, 33-36.
- Ashall V, Millar KM, Hobson-West P, 2018: Informed consent in veterinary medicine: Ethical implications for the profession and the animal 'patient'. *Food ethics*, 1, 247-258.
- Baniaghil AS, Ghasemi S, Rezaei-Aval M, Behnampour N, 2022: Effect of communication skills training using the Calgary-Cambridge Model on interviewing skills among midwifery students: a randomized controlled trial. *Iran J Nurs Midwifery Res*, 27 (1), 24-29.
- Englar RE, Williams M, Weingand K, 2016: Applicability of the Calgary-Cambridge Guide to dog and cat owners for teaching veterinary clinical communication. *J Vet Med Educ*, 43 (2), 143-169.
- Eskandari M, Hosseini F, Razjouyan K, Abadi A, 2021: Examining doctor-patient communication skills among senior medical students based on calgary cambridge observation guide. *Med J Islam Repub Iran*, 35, 122.

- Flemming DD, Scott JF, 2004: The informed consent doctrine: what veterinarians should tell their clients. *J Am Vet Med Assoc*, 224 (9), 1436-1439.
- Gray C, 2020: Role of the consent form in UK veterinary practice. *Vet Record*, 187 (8), 318.
- Greenhill N, Anderson C, Avery A, Pilnick A, 2011: Analysis of pharmacist-patient communication using the Calgary-Cambridge guide. *Patient Educ Couns*, 83 (3), 423-431.
- Hiestand KM, 2022: The autonomy principle in companion veterinary medicine: A critique. *Front Vet Sci*, 9, 953925.
- Janke N, Coe JB, Bernardo TM, Dewey CE, Stone EA, 2021: Pet owners' and veterinarians' perceptions of information exchange and clinical decision-making in companion animal practice. *PLoS ONE*, 16 (2), e0245632.
- Kılınc A, 2007: Probleme dayalı öğrenme. *Kastamonu Eğitim Dergisi*, 15 (2), 561-578.
- Kurtz SM, Silverman J, 1996: The Calgary-Cambridge Referenced Observation Guides: An aid to defining the curriculum and organizing the teaching in communication training programmes. *J Vet Med Educ*, 30 (2), 83-89.
- McGriff, SJ, 2000: Instructional System Design (ISD): Using the ADDIE Model. <https://www.lib.purdue.edu/sites/default/files/directory/butler38/ADDIE.pdf>, Erişim Tarihi: 26.04.2023
- Meisel A, Kuczewski M, 1996: Legal and ethical myths about informed consent. *Arch Intern Med*, 156 (22), 2521-2526.
- Munson E, Willcox A, 2007: Applying the Calgary-Cambridge model. *Pract Nurs*, 18 (9), 464-468.
- Osmanagaoglu S, Kalkan M, Melikoglu B, Mentec Gurler A, Ozkul T, Yigit A, 2011: Attitudes of Turkish veterinary educators to problem-based learning. *J Anim Vet Adv*, 10 (17), 2297-2300.
- Özen R, 2005: Hayvan gönencinde etik karar verme süreci ve temel etik ilkeler. In: Türkiye'de Birinci Hayvan Refahı ve Veteriner Hekimliği Eğitimi Konferansı Bildiriler Kitabı, Ankara, s.83-91.
- Özkul T, Genç, SV, Doğan Ö, Özen A, 2008: Views of Turkish veterinary practitioners on the veterinary consultation. *Vet Rec*, 163, 189-190.
- Sommer J, Lanier C, Perron NJ, Nendaz M, Clavet D, Audétat MC, 2016: A teaching skills assessment tool inspired by the Calgary-Cambridge model and the patient-centered approach. *Patient Educ Couns*, 99 (4), 600-609.
- Temel MK, 2017: Biyomedikal Etik Prensipleri. Yedinci Edisyon, Pınarbaşı Matbaacılık, İstanbul, Türkiye.
- Ünsal Adaca A, 2023: Veteriner hekimliğinde iletişim becerileri için Calgary-Cambridge kılavuzlarının Türkçeye uyarlanması. *Vet Hekim Der Derg*, 94 (1), 36-49.
- Yerlikaya H, Özen A, 2001: Türkiye'de veteriner hekimliği eğitiminde Türkçeleşme süreci. *Vet Bil Derg*, 17 (2), 151-158.



## The Effect of the Addition of Different Rates of Sumac (*Rhus coriaria*) Powder to Maize on Silage Fermentation and Aerobic Stability

Besime DOĞAN DAŞ<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-2163-2632

Received: 25.03.2023

Accepted: 02.05.2023

**How to cite this article:** Doğan Daş B. (2023). The Effect of the Addition of Different Rates of Sumac (*Rhus coriaria*) Powder to Maize on Silage Fermentation and Aerobic Stability. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 53-57, DOI:10.31196/huvfd.1270861.

**\*Correspondence:** Besime DOĞAN DAŞ

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.  
e-mail: bdas@harran.edu.tr

Available on-line at: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Abstract:** This study aims to determine the effects of adding different rates of sumac powder to maize (0%, 0.5%, 1%, and 2%) on fermentation properties, silage quality, and aerobic stability. In the study, 16 silage samples, four repetitions from each group, were placed in 1.5-liter glass jars and compressed. Silages were left to ferment for 60 days. In addition, the silages were subjected to an aerobic stability test for five days immediately after opening. The lowest CO<sub>2</sub> value was determined in the 0.5% sumac group ( $P<0.05$ ). The pH values of the silages were determined between 3.65 and 3.74 ( $P<0.05$ ). Silages were evaluated as high quality according to the Flieg scoring system. The addition of sumac powder to maize increased the number of lactic acid bacteria by reducing the total yeast mold with the formation of carbon dioxide ( $P<0.05$ ). As a result, it was determined that adding sumac powder to maize positively affects silage fermentation, improves aerobic stability, and increases lactic acid bacteria by preventing total yeast mold formation. As a result of the research, it was determined that using 1% and 2% sumac powder while making maize silage can increase silage quality characteristics. It was concluded that this study should be supported by *in vitro* and *in vivo* trials.

**Keywords:** Aerobic stability, Corn silage, Silage fermentation, Sumac.

### Mısır Silajına Farklı Oranlarda Sumak (*Rhus coriaria*) Tozu İlavesinin Silaj Fermantasyonu ve Aerobik Stabilite Üzerine Etkisi

**Özet:** Bu araştırmanın amacı, mısır hasılına farklı (%0, %0.5, %1 ve %2) oranlarda sumak tozu ilavesinin fermantasyon özellikleri, silaj kalitesi ve aerobik stabilite üzerine etkilerini belirlemektir. Araştırmada, her gruptan 4 tekrür olmak üzere toplam 16 adet silaj örneği 1.5 litrelik cam kavanozlara konularak sıkıştırılmıştır. Silajlar 60 gün süresince fermantasyona bırakılmıştır. Ayrıca, silajlar açıldıktan hemen sonra 5 gün süre ile aerobik stabilite testine tabi tutulmuştur. En düşük CO<sub>2</sub> değeri %0,5 sumak grubunda belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Silajların pH değerleri 3.65 ile 3.74 arasında belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Flieg puanlama sistemine göre silajlar kaliteli olarak değerlendirilmiştir. Mısır hasılına sumak tozu ilavesi, karbondioksit oluşumu ve toplam maya küf sayısını azaltarak, laktik asit bakteri sayısını arttırmıştır ( $P<0.05$ ). Sonuç olarak mısır hasılına sumak tozunun katılmasının, silaj fermantasyonunu olumlu yönde etkilediği, aerobik stabiliteyi iyileştirdiği ve toplam maya küf oluşumunu engelleyerek, laktik asit bakterilerini artırdığı belirlenmiştir. Araştırma sonucunda mısır silajı yapılırken %1 ve %2 seviyelerinde sumak tozunun kullanılmasının silaj kalite özelliklerini artırabileceği belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmanın *in vitro* ve *in vivo* denemelerle desteklenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Aerobik stabilite, Mısır silajı, Silaj fermantasyonu, Sumak.

## Introduction

One of the most essential issues for livestock farmers is the quality of the roughage. Roughage is an important part of livestock farming. Silage production is emphasized to ensure the balanced nutrition of ruminants in winter and to meet the need for high-quality roughage (Keskin et al., 2016). Maize silage is the world's most widely used silage in silage production (Borreani et al., 2018; García-Chávez et al., 2020).

Recently, the interest in natural products has brought up the use of aromatic plants and products obtained from there in food, animal nutrition, and medicine. However, there is limited research on using these aromatic plants and extracts as silage additives (Chaves et al., 2012; Kung et al., 2008; Önenç et al., 2015; Turan, 2015).

Studies on the nutrition of ruminants have shown that phenolic and flavonoids- containing plants are significant in terms of rumen health and animal productivity (Formato et al., 2022; Lee et al., 2017; Rochfort et al., 2008). Dohi et al. (1997) reported that feed intake and, thus, animal yield increased in animals fed with plants containing phenolic compounds. Santos-Neto et al. (2009) and Frozza et al. (2013) stated that these compounds have antioxidant and antimicrobial effects and reported that flavonoids and phenolic compounds also control nutritional stresses such as rumen fermentation, bloat and acidosis (Paula et al., 2016; Seradj et al., 2014) and that phenolic compounds both promote fermentation in silage and give an aromatic taste to silage (Gülümser et al., 2022).

Sumac, often called as *Rhus coriaria* L., is a Mediterranean plant member of the Anacardiaceae family and is usually employed as a spice and flavoring (Batiha et al., 2022; Rayne and Mazza, 2007). Sumac contains various compounds such as organic acids, proteins, essential oils, minerals, vitamins, and phenolics. Sumac has an important antioxidant role as it is rich in phenolic compounds, especially gallic acid and its derivatives (Rad et al., 2020; Sakhr and Khatib, 2020).

This study determined the effects of adding different rates (0%, 0.5%, 1%, and 2%) of sumac powder to corn green as an antimicrobial additive on silage quality and fermentation properties.

## Materials and Methods

Corn green was used as silage material in the study. Corn green was ensiled by adding 0%, 0.5%, 1%, and 2% sumac

powder at different rates. In the experiment, four groups were formed. A total of 16 silage samples, four of which were repetitions from each group, were compressed into 1.5-liter glass jars. The caps of the glass jars were drilled, the jars were inverted, and silo water drainage was provided for 48 hours. The jars were opened after a 60-day incubation period. The pH values were measured immediately after the opening the silages (Polan et al., 1998). Ammonia nitrogen analyses were performed according to the method reported by Broderick and Kang (1980). Dry matter (DM), crude protein (CP) and crude ash (CA) analyzes were performed according to the Weende analysis system (AOAC, 2005), and ADF and NDF analyzes were performed according to the method reported by Van Soest et al. (1991). The silages opened were subjected to an aerobic stability test (determination of CO<sub>2</sub> production values) (Ashbell et al., 1991). The LAB, total yeast mold counts of the silages made by the method developed by Seale et al. (1990). Fleig scoring of silages was calculated with the equation of

$$\text{Fleig Score} = 220 + (2 \times \% \text{ Dry Matter} - 15) - 40 \times \text{pH}$$

reported by Kılıç (1984).

The data obtained at the end of the study were evaluated with a one-way analysis of variance (One Way ANOVA) in the SPSS (2008) software program. Duncan's multiple comparison tests were used to compare the mean scores between the groups.

This study is not subject to Ethics Committee permission under Article 8 (k2) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees".

## Results

DM, CA, CP, ADF, and NDF values of corn silage used in the study were found to be 27.22%, 7.83% DM, 10.54% DM, 32.39%, and 57.11% DM, and sumac powder was found to be 96.68%, 2.64% DM, 3.1% DM, 27.17 and 61.29% DM, respectively.

The nutrient contents of corn silage with different amounts of sumac powder are given in Table 1. When Table 1 was examined, there was no statistically significant difference between the DM, CA, and CP values of the silage groups ( $P>0.05$ ), while there was a statistically significant difference between the ADF and NDF values ( $P<0.05$ ). In addition, ADF values increased in parallel with the increase in sumac powder.

**Table 1:** The nutrient content of the corn silages with different amounts of sumac powder.

	DM	CA	CP	ADF	NDF
Control	26.69	7.54	7.36	32.46 <sup>c</sup>	59.41 <sup>b</sup>
0.5% Sumac	26.44	7.84	7.15	36.03 <sup>b</sup>	59.11 <sup>b</sup>
1% Sumac	27.06	7.44	7.83	35.66 <sup>b</sup>	63.18 <sup>a</sup>
2% Sumac	27.00	7.81	7.29	38.73 <sup>a</sup>	62.93 <sup>a</sup>
SEM	0.128	0.120	0.097	0.585	0.611
P	0.300	0.611	0.056	<b>0.000</b>	<b>0.005</b>

<sup>a-c</sup>Values with different letters in the same column were found to be different ( $P<0.05$ ), SEM: Standart Error of Mean; DM: Dry matter, %; CA: Crude ash, DM%, CP: Crude protein, DM%, ADF: Acid detergent fiber, DM%; NDF: Neutral detergent fiber, DM%.

The fermentation characteristics, Fleig scores, total yeast mold, and lactic acid bacteria counts of the silages obtained by adding sumac powder were given in Table 2. While there was a statistically significant difference between the groups in terms of pH, NH<sub>3</sub>-N, CO<sub>2</sub>, total yeast mold, and lactic acid bacteria counts of silages in all groups ( $P<0.05$ ),

there was no statistically significant difference between the Fleig scores ( $P>0.05$ ). The pH values of the silages obtained were determined between 3.65 and 3.74. Fleig scores were determined to be above 100 points. In parallel with the increase in sumac powder, a decrease was observed in total yeast and mold values ( $P<0.05$ ).

**Table 2:** The effect of corn silages prepared by adding sumac powder at different rates on the fermentation properties and silage quality.

	pH	NH <sub>3</sub> -N	CO <sub>2</sub>	Fleig	Total Yeast-Mold cfu/g	LAB kob/g
Control	3.65 <sup>c</sup>	8.57 <sup>b</sup>	3.00 <sup>a</sup>	111.51	8.35 <sup>a</sup>	6.85 <sup>b</sup>
0.5% Sumac	3.65 <sup>c</sup>	9.47 <sup>a</sup>	1.70 <sup>c</sup>	110.63	8.35 <sup>a</sup>	7.14 <sup>ab</sup>
1% Sumac	3.68 <sup>b</sup>	8.03 <sup>b</sup>	1.97 <sup>bc</sup>	112.47	7.73 <sup>ab</sup>	8.30 <sup>a</sup>
2% Sumac	3.74 <sup>a</sup>	8.51 <sup>b</sup>	2.41 <sup>ab</sup>	111.30	6.95 <sup>b</sup>	8.26 <sup>a</sup>
SEM	0.011	0.185	0.155	0.528	0.197	0.237
P	<b>0.000</b>	<b>0.024</b>	<b>0.003</b>	0.714	<b>0.015</b>	<b>0.033</b>

<sup>a-c</sup>; Values with different letters in the same column were found to be different ( $P<0.05$ ), SEM: Standart Error of Mean; CO<sub>2</sub>: Carbon dioxide formation, g/kg DM, NH<sub>3</sub>-N/TN: Ammonia nitrogen rate in total nitrogen (TN) content % NH<sub>3</sub>-N/TN, LAB: Lactic Acid Bacteria cfu/g.

## Discussion and Conclusion

The results obtained from nutrient analysis of silages opened after 60 days showed no increase in DM values. This may be due to the low rates of sumac powder added to maize. DM values of maize silages in the current study are within the ranges of the values for quality silages (20-35%) reported by Ergül (1993). There was no statistically significant difference between the crude ash values of the silages. In addition, there was no difference between the groups in the crude protein values of the silages, and it was concluded that this might be due to the low crude ash and crude protein values of the sumac material used.

The ADF and NDF values of the silages obtained increased in parallel with the increase in sumac addition ( $P<0.05$ ). The ADF rate refers to the amount of cellulose, lignin, and insoluble protein in the structure of the plant cell wall. The ADF rate is a good indicator that gives an idea about the digestibility of the feed and the energy intake of the animal. The NDF rate refers to the whole fiber in the plant, including hemicellulose and fiber (Seydoşoğlu and Gelir, 2019). In the present study, the increase in ADF and NDF can be attributed to the high cell wall elements in sumac powder.

When silage ammonia nitrogen values were examined, all values obtained lower than 11%. Carpintero et al. (1979) reported that silage ammonia nitrogen being lower than 11% referred that silages were in good quality silage class.

The change between the Fleig scores calculated by using the DM and the silage pH values was not statistically significant ( $P>0.05$ ). In all experimental groups, the values were determined to be above 100 points, and it was determined that the silages were in the Excellent class. Since it is an easily ensiled plant, no additives are required for the silage of maize (Güney et al., 2010). For this reason, the control group was also included in the class of quality silages according to the Fleig score. In addition, the very low ratio of sumac in silages, may have caused no difference between the groups. According to the Fleig scoring system, it is seen

that there is a strong relationship between DM values, pH values, and Fleig scores of silages (Yalçınkaya et al., 2012).

The first few days of ensiling are critical for good fermentation. Under favorable conditions, lactic acid bacteria rapidly acidify silage, reducing pH and preventing the development of unwanted microorganisms, especially *enterobacteria*, *clostridia*, and yeasts (McDonald et al., 1991). The pH of the silages obtained in this study was between 3.65-3.74 and was among the required pH values. When Table 2 is examined, it is seen that the low pH values of silages decrease the total yeast mold growth and increase the number of lactic acid bacteria (LAB) (Filya, 2018; Guan et al., 2021). In silage fermentation, LAB is the essential microorganism because silo feed is protected by the lactic acid produced by LAB (McDonald et al., 1991). The main point of improving the silage quality is the increased number of LAB. Therefore, the increase in LAB in the treatment groups in this study indicates that adding sumac powder effectively improves the quality of silage.

In this study conducted, when the carbon dioxide value of the silages was examined, it was determined that the lowest carbon dioxide value (1.70 g/kg DM) was 0.5% sumac powder addition in the experimental group. Accordingly, it was observed that silages with 0.5% sumac powder added improved aerobic stability ( $P<0.05$ ). Similarly, Önenç et al. (2019) determined the effects of adding thyme and cumin essential oil to alfalfa on fermentation quality and aerobic stability. They found that adding of thyme and cumin essential oil significantly reduced pH, water-soluble carbohydrate, and ammonia nitrogen, increased dry matter and lactic acid contents, decreased yeast and mold counts, and increased lactic acid bacteria counts. They reported that adding of thyme and cumin essential oils to alfalfa 650 mg/kg promotes silage fermentation and improves aerobic stability. This report supports our study wherein adding of sumac (0.5%, 1%, and 2%) to maize silage reduced the total number of yeast molds and increased the number of lactic acid bacteria.

As a result of the research, it was determined that adding different rates (0.5%, 1%, and 2%) of sumac powder reduced the number of silage yeasts and molds with CO<sub>2</sub> production and improved aerobic stability by increasing the number of LAB. Due to these positive effects, sumac powder can be added at 1% and 2% levels while making maize silage. However, it was concluded that this study should be supported by *in vitro* and *in vivo* trials.

### Conflict of Interest

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

### 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".

### 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: BDD  
Design: BDD  
Control/Supervision: BDD  
Data Collection and / or Processing: BDD  
Analysis and / or Interpretation: BDD  
Literature Review: BDD  
Writing the Article: BDD  
Critical Review: BDD

### References

- AOAC, 1990: Official methods of analysis, Association of official analytical chemists, Washington DC.
- Ashbell G, Weinberg ZG, Azrieli A, Hen Y, Horev B, 1991: A simple system to study the aerobic determination of silages. *Can Agric Eng*, 34, 171-175.
- Batiha GES, Ogunyemi OM, Shaheen HM, Kutu FR, Olaiya CO, Sabatier JM, De Waard M, 2022: Rhus coriaria L.(Sumac), a versatile and resourceful food spice with cornucopia of polyphenols. *Molecules*, 27 (16), 5179.
- Borreani G, Tabacco E, Schmidt RJ, Holmes BJ, Muck RE, 2018: Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J Dairy Sci*, 101 (5), 3952-3979.
- Broderick GA, Kang JH, 1980: Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *J Dairy Sci*, 63 (1), 64-75.
- Carpintero CM, Henderson AR, McDonald P, 1979: The effect of some pre-treatments on proteolysis during the ensiling of herbage. *Grass Forage Sci*, 34, 311-315.
- Chaves AV, Baah J, Wang Y, McAllister TA, Benchaar C, 2012: Effects of cinnamon leaf, oregano and sweet orange essential oils on

- fermentation and aerobic stability of barley silage. *J Sci Food Agric*, 92, 906-915.
- Güney E, Tan M, Gül Z D, Gül İ, 2010: Erzurum şartlarında bazı silajlık mısır çeşitlerinin verim ve silaj kalitelerinin belirlenmesi. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg*, 41 (2), 105-111.
- Dohi H, Yamada A, Fukukawa T, 1997: Intake stimulants in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) fed to sheep. *J Dairy Sci*, 80, 2083-2086.
- Ergül M, 1993: Feeds knowledge and technology. 2nd ed., Ege University Faculty of Agriculture Publications, İzmir.
- Filya İ, 2018: Developments in silage fermentation and a future perspective. In: 2nd International Animal Nutrition Congress, Antalya, Türkiye.
- Formato M, Cimmino G, Brahmi-Chendouh N, Piccolella S, Pacifico S, 2022: Polyphenols for livestock feed: Sustainable perspectives for animal husbandry? *Molecules*, 27 (22), 7752.
- Frozza COS, Garcia CSC, Gambato G, de Souza MD, Salvador M, Moura S, Padilha FF, Seixas FK, Collares T, Borsuk S, Dellagostin OA, Henriques JA, Roesch-Ely M, 2013: Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol*, 52, 137-142.
- García-Chávez I, Meraz-Romero E, Castelán-Ortega O, Esparza JZ, Avalos JO, Jimenez LER, González-Ronquillo M, 2020: Corn silage, meta-analysis of the quality and yield of different regions in the world. *Preprints*, 2020100094.
- Guan H, Ran Q, Li H, Zhang X, 2021: Succession of microbial communities of corn silage inoculated with heterofermentative lactic acid bacteria from ensiling to aerobic exposure. *Fermentation*, 7 (4), 258.
- Gülümser E, Mut H, Başaran U, Doğrusöz MÇ, 2022: Hop (*Humulus lupulus* L.) as a Roughage Source. *Bilecik Seyh Edebali Univ J Sci*, 9 (1), 609-615.
- Keskin B, Yılmaz H, Temel S, Eren B, 2016: Determination of yield and some plant characteristics in some silage corn varieties. In: VII International Scientific Agriculture Symposium, "Agrosym 2016", Jahorina, Bosnia and Herzegovina, pp. 803-807.
- Kılıç A, 1984: Silage feed. Bilgehan Press, İzmir, Türkiye, pp. 350.
- Kung JL, Williams P, Schmidt RJ, Hu W, 2008: A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 91, 4793-4800.
- Lee SHY, Humphries DJ, Cockman DA, Givens DI, Spencer JPE, 2017: Accumulation of citrus flavanones in bovine milk following citrus pulp incorporation into the diet of dairy cows. *EC Nutr*, 7 (4), 143-154.
- McDonald P, Henderson AR, Heron SJE, 1991: The biochemistry of silage. Chalcombe publications, Marlow, UK.
- Önenç SS, Koç F, Coşkuntuna L, Özdüven ML, Gümüş T, 2015: The effect of oregano and cinnamon essential oils on fermentation quality and aerobic stability of field pea silages. *Asian-australas. J Anim Sci*, 28 (9), 1281-1287.
- Önenç SS, Turgud FK, Uçman AT, 2019: Effects of Oregano and Cumin Essential Oils on Fermentation Quality, Aerobic Stability and *In Vitro* Metabolic Energy Contents of Alfalfa Silages. *J Anim Prod*, 60 (2), 117-123.
- Paula EM, Samensari RB, Machado E, Pereira LM, Maia FJ, 2016: Effects of phenolic compounds on ruminal protozoa population, ruminal fermentation, and digestion in water buffaloes. *Livest Sci*, 185, 136-41.
- Polan CE, Stieve DE, Garrett JL, 1998: Protein preservation and ruminal degradation of ensiled forage treated with heat, formic acid, ammonia, or microbial inoculant. *J Dairy Sci*, 81 (3), 765-776.

- Rad AH, Khaleghi M, Javadi M, 2020: Sumac in food industry: a changing outlook for consumer and producer. *J Food Technol Nutr Sci*, 2 (1), 1-3.
- Rayne S, Mazza G, 2007: Biological activities of extracts from sumac (*Rhus* spp.): a review. *Nat Prec*, 1-1.
- Rochfort S, Parker AJ, Dunshea FR, 2008: Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochem*, 69 (2), 299–322.
- Sakhr K, Khatib SE, 2020: Physiochemical properties and medicinal, nutritional and industrial applications of Lebanese Sumac (Syrian Sumac - *Rhus coriaria*): A review. *Heliyon*, 6 (1), e03207.
- Seale DR, Pahlow G, Spoelstra SF, Lindgren S, Dellaglio F, Lowe JF, 1990: Methods for the microbiological analysis of silage. In: Proceeding of the Eurobac Conference, Uppsala, Sweden, pp.147.
- Seradj AR, Abecia L, Crespo J, Villalba D, Fondevila M, Balcells J, 2014: The effect of Bioflavex® and its pure flavonoid components on in vitro fermentation parameters and methane production in rumen fluid from steers given high concentrate diets. *Anim Feed Sci Technol*, 197, 85-91.
- Seydoşoğlu S, Gelir G, 2019: Research on the Silage Properties of Grasspea (*Lathrus sativus* L.) and Barley (*Hordeum vulgare* L.) Herbages Mixed at Different Rates. *J Inst Sci Technol*, 9 (1), 397-406.
- SPPS, 2008: Inc, SPSS Statistics for Windows, Version, Chicago.
- Turan A, 2015: Effect of cumin essential oil usage on fermentation quality and aerobic stability of alfalfa silage. Master's thesis, NKU Graduate School of Natural and Applied Science, Tekirdağ.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA, 1991: Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*, 74, 3583-3597.
- Yalçınkaya MY, Baytok E, Yörük MA, 2012: Some Physical and Chemical Properties of Different Fruit Pulp Silages. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 9 (2), 95-106.



## Broiler Rasyonlarına Probiyotik ile Zencefil (*Zingiber officinale*) İlavesinin Besi Performansı, Karkas Parametreleri ve Et Kalitesi Üzerine Etkisi

Nurcan KIRAR<sup>1,a,\*</sup>, Faruk BOZKAYA<sup>2,b</sup>, Mehmet Osman ATLI<sup>3,c</sup>, Mehmet AVCI<sup>1,d</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları  
Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Zootekni ve Hayvan Besleme Bölümü  
Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>3</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Klinik Bilimler Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-2778-1789

<sup>b</sup>ORCID: 0000-0001-6423-8067

<sup>c</sup>ORCID: 0000-0001-9853-5334

<sup>d</sup>ORCID: 0000-0002-2523-2137

**Geliş Tarihi:** 14.04.2023

**Kabul Tarihi:** 05.05.2023

**Bu makale Nasıl kaynak gösterilir:** Kirar N,  
Bozkaya F, Atli MO, Avcı M. (2023). Broiler  
Rasyonlarına Probiyotik ile Zencefil (*Zingiber  
officinale*) İlavesinin Besi Performansı, Karkas  
Parametreleri ve Et Kalitesi Üzerine Etkisi.  
Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Dergisi, 12(1): 58-66,  
DOI:10.31196/huvfd.1282563.

**\*Yazışma adresi:** Nurcan KIRAR

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları  
Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.  
e-mail: nurcankirar63@gmail.com

Online erişim adresi:

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Abstract:** Bu çalışma, broiler rasyonlarına probiyotik ve zencefil (*Zingiber officinale*) ilavesinin besi performansı, karkas parametreleri ve et kalite parametreleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Araştırmada hayvan materyali olarak 396 adet Ross (308 erkek ve dişi karışık cinsiyette) etlik civciv kullanılmıştır. Civcivler her biri 11 hayvandan oluşan 6 tekerrürlü 6 gruba ayrılmıştır. Çalışma gruplarının rasyonları kontrol, %0.3 zencefil, %0.6 zencefil, %0.05 probiyotik, %0.05 probiyotik + %0.3 zencefil, %0.05 probiyotik + %0.6 zencefil ilave edilerek hazırlanmıştır. Deneme 42 gün sürdürülmüş ve haftalık olarak canlı ağırlık (CA), canlı ağırlık artışları (CAA), yem tüketimleri (YT) ve yemden yararlanma oranları (YYO) belirlenmiştir. 42. gün kesilen her hayvanın karkas parametreleri ve iç organ ağırlıkları, göğüs eti kalite parametrelerinden renk, pH, pişirme kaybı, su tutma kapasitesi ve beyaz çizgi skoru değerleri analiz edilmiştir. Yapılan çalışmada %0.05 probiyotik ilavesinin canlı ağırlık ve canlı ağırlık artışını arttırdığı, yemden yararlanma oranını iyileştirdiği belirlenmiştir. Denemede %0.3 zencefil katkısı ilavesinin canlı ağırlık ve canlı ağırlık artışı üzerine etkisinin olmadığı, %0.6 zencefil, %0.05 probiyotik, %0.05 probiyotik + %0.3 zencefil ile %0.05 probiyotik + %0.6 zencefil kombinasyonlarının olduğu gruplarda ise canlı ağırlık ve canlı ağırlık artışının arttığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla probiyotik, zencefil ve probiyotik+zencefil ilavesinin yem tüketimini düşürdüğü ve yemden yararlanma oranını iyileştirdiği belirlenmiştir. Probiyotik katkısının ve probiyotik+ zencefil kombinasyonlarının göğüs ağırlık yüzdesini arttırdığı gözlemlenmiştir. Probiyotik, zencefil, probiyotik+zencefil kombinasyonlarının ilavesinin göğüs eti kalite parametreleri üzerine olumlu etkileri olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak broiler rasyonlarına %0.05 probiyotik ilavesinin besi performansını iyileştirdiği ekonomik ve uygulanabilir olması nedeniyle broiler rasyonlarında kullanımının önerilebileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Broiler, Probiyotik, Zencefil.

### The Effect of Additional Probiotic and Ginger (*Zingiber officinale*) to Broiler Rations on Growth Performance, Carcass Parameters, and Meat Quality

**Abstract:** This study was carried out to determine the effects of adding probiotics and ginger (*Zingiber officinale*) to broiler rations on growth performance, carcass parameters, and meat quality parameters. In the study, 396 Ross (308 male and female mixed gende) broiler chickens were used as animal material. The chicks were divided into six groups with six replicates, each containing 11 animals. The rations of the study groups were prepared by adding control, 0.3% ginger, 0.6% ginger, 0.05% probiotic, 0.05% probiotic + 0.3% ginger, and 0.05% probiotic + 0.6% ginger. The experiment was continued for 42 days, and body weight (BW), body weight gains (BWG), feed consumption (FC) and, feed conversion rates (FCR) were determined weekly. 42-day carcass parameters and visceral weights of each slaughtered animal, breast meat quality parameters such as color, pH, cooking loss, water holding capacity, and white line score were analyzed. The study determined that adding 0.05% probiotics increased the body weight and body weight gain and improved the feed conversion ratio. In the experiment, it was observed that the addition of 0.3% ginger supplement did not affect body weight and body weight gain. However, body weight and body weight gain increased in groups with 0.6% ginger, 0.05% probiotic, 0.05% probiotic + 0.3% ginger, and 0.05% probiotic + 0.6% ginger combinations. It was determined that adding probiotics, ginger, and probiotic+ginger decreased feed consumption and improved the feed conversion ratio compared to the control group. It has been observed that the probiotic supplement and probiotic+ginger combinations increase the breast weight percentage. It was determined that adding probiotic, ginger, and probiotic+ginger combinations positively affected breast meat quality parameters. As a result, adding 0.05% probiotics to broiler rations can be recommended because it is economical and applicable, improves the growth performance, and can be recommended for use in broiler rations.

**Keywords:** Broiler, Ginger, Probiotic.



## Giriş

Hastalıklardan korunma ve verim arttırmak amacıyla antibiyotik kullanımı pek çok antibiyotiğe karşı dirençli bakteri suşlarının oluşmasına yol açtığından Avrupa Birliği ülkeleri ve Türkiye’de antibiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanımı yasaklanmıştır. Kısa sürede yüksek canlı ağırlık sağlamak ve hastalıklardan korumak amacıyla broiler rasyonlarına çeşitli verim arttırıcı yem katkı maddeleri katılmaktadır (Daş ve ark., 2020; Karademir ve Karademir 2003; Kırar ve ark., 2020). Bu amaçla probiyotikler, prebiyotikler, bitkilerin toz formları, ekstraktları, propiyonat ve bütirat gibi esansiyel yağlar ve organik asitler gibi ürünler alternatif büyüme uyarıcı olarak kullanılmaktadır (Sevim ve ark., 2021). Yapılan çalışmalarda, tıbbi ve aromatik bitkiler ve ekstraktlarının antimikrobiyel etkileri nedeniyle hayvansal verimleri iyileştirdiklerinden dolayı antibiyotiklere alternatif yem katkı maddesi olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (Göktaş ve Gidik, 2019). Zencefilin kümes hayvanlarında yemin lezzetini, besin emilimini ve mide salgısını arttırarak büyümeyi ve döl verimini iyileştirmesi yanında antibakteriyel etkileri de bulunmaktadır. Zencefil, güçlü antioksidan aktiviteye sahip olan gingerol, gingerdiol ve gingerdione gibi çeşitli etken maddeler içermektedir (Bayar, 2020; Rahman ve ark., 2009). Zencefilin sindirim sistemini düzenleyici etkileri yanında analjezik, antienflamatuar antimikrobiyal ve antikanserijen etkilerinin de olduğu bildirilmiştir (Balğa ve ark., 2011; Bayar, 2020; El-Hack ve ark., 2020; Gökmen ve ark., 2022). Rafiee ve ark. (2014), rasyonlarına %0.2 oranında zencefil ilave edilen broilerlerde canlı ağırlık artışı ve yem tüketiminin arttığını bildirmişlerdir. Kanatlı karma yemlerinde kullanılan probiyotikler etkilerini hayvanlarda canlı ağırlık artışının artması, yemden yararlanma oranının iyileşmesi, mide-bağırsak rahatsızlıklarının azalması şeklinde göstermektedirler. Probiyotikler bağırsak duvarındaki villuslara çok daha erken sürede ulaşarak patojenlerin sindirim kanalında barınmalarını engellemektedir (Bahadıroğlu, 1997; Yılmaz, 2021). Diğer taraftan probiyotikler, ürettikleri asetik asetik veya laktik asit gibi organik asitlerle bağırsak pH’sını düşürür (pH’ı 4-4.5’un altına) ve nötr veya bazik pH’da yaşayan patojen mikroorganizmaların gelişmelerini önlerler (Jernigan, 1985). Hayvanın sindirim sisteminde üretilen enzimlerle simbiyotik etki gösteren lipaz, selülaz, proteaz, ksilanaz, amilaz,  $\beta$ -glukanaz gibi enzimleri üreterek özellikle sindirim sistemi gelişmekte olan genç hayvanlarda sindirime destek olmaktadır (Vanbelle, 1990). Yem katkı maddeleri, broiler üretkenliğini ve tüketici güvenliğini en üst düzeye çıkarmak için değişen kombinasyonlarda sıklıkla kullanılır. Bu sebeple diyetle kullanılan farklı yem katkı maddelerinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla bu çalışmada broiler piliçlerde probiyotik ve zencefil ilavesinin tek tek ya da kombine halde besi performansı, karkas parametreleri ve et kalite parametreleri üzerine etkisi incelenmiştir.

## Materyal ve Metot

Araştırma, Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 11/122020-2020/006/008 nolu kararı ile

onaylanmıştır. Araştırmada hayvan materyali olarak ticari bir firmadan temin edilen 396 adet Ross 308 erkek ve dişi karışık broiler civciv kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan yemler NRC (1994)’ de bildirilen besin ihtiyaçlarına uygun şekilde hazırlanmıştır. Kontrol grubuna verilen rasyon, zencefil ya da probiyotik ilave edilmeksizin hazırlanmıştır. Deneme grubu hayvanların yemlerine ise zencefil ve probiyotik katkı maddeleri eklenmiştir. Deneme grupları; kontrol, %0.05 probiyotik (%0.05 Pro), %0.3 zencefil (%0.3 Zen), %0.6 zencefil (%0.6 Zen), %0.3 zencefil + %0.05 probiyotik (%0.3 Zen + %0.05 Pro), %0.6 zencefil + %0.05 probiyotik (%0.6 Zen + %0.05 Pro) şeklinde toplam 6 gruptan oluşturulmuştur. Katkı maddeleri rasyona ilk günden besi sonuna kadar ilave edilmiştir. Çalışmada kullanılacak probiyotik ticari bir firmadan satın alınmıştır (*Bacillus subtilis* içeriği ( $2 \times 10^{12}$  KOB/kg)). Çalışmada hazırlanan yemler ve kullanılan zencefilin ham besin madde analizleri AOAC (2005)’e göre yapılmıştır. Metabolik enerji (ME) değerleri Carpenter ve Clegg’in (1956) bildirdiği formül kullanılarak hesaplanmıştır. Araştırma kümes içerisinde her bir deneme grubu için  $1m^2$  alana sahip altı adet bölmede sürdürülmüştür. Her bölmede 11 hayvan olacak şekilde dağıtılmıştır. Deneme odasının sıcaklığı birinci hafta 33 °C, ikinci hafta 30 °C, üçüncü hafta 27 °C, daha sonraki haftalarda ise 22-24 °C’ye ayarlanmıştır. Nispi nem ise çalışma boyunca %40-50 düzeylerinde tutulmuştur. Denemede 1 saat karanlık 23 saat aydınlık olacak şekilde aydınlatma planı uygulanmış, altlık materyali olarak odun talaşı kullanılmıştır. Araştırmada tüm hayvanlara su ve yem ad libitum olacak şekilde grup yemlemesi uygulanmıştır. Deneme süresince broiler civcivlere 1. günden 11. güne kadar broiler başlangıç yemi, 11. günden 24. güne kadar broiler büyütme yemi, 25. günden 42. güne (kesim günü) kadar broiler bitirme yemi verilmiştir. Civcivler denemenin 1. ve 12. günü newcastle ve enfeksiyöz bronşitiz virüslerini içeren karma bir aşı ile 17.günü ise gumboro virüslerini içeren aşilar ile aşılanmıştır. Newcastle aşısı 21. gün tekrarlanmıştır. Deneme 42 gün sürdürülmüş ve 42. gün kesim işlemi uygulanmıştır. Hayvanlar deneme başında ve denemenin, 7, 14, 21, 28, 35 ve 42. günlerinde bireysel olarak tartılmış ve gruplara ait canlı ağırlık ortalamaları tespit edilmiştir. Tartımlar arasındaki farktan canlı ağırlık artışları tespit edilmiştir. Denemenin 7, 14, 21, 28, 35 ve 42. günlerinde yemliklerde kalan yem miktarı, o hafta içerisinde her tekerrür grubuna (alt gruba) verilen toplam yem miktarından çıkartılarak her tekerrür grubunun o hafta içerisinde tükettiği toplam yem belirlenmiştir. Haftalık toplam yem tüketimi hayvan sayısına bölünerek yem tüketimleri ve grupların ortalamaları hesaplanmıştır. Hayvanların deneme süresince iki tartım aralığında tükettikleri ortalama yem miktarları, bu iki tartım aralığında hesaplanan ortalama canlı ağırlık artışına bölünerek yemden yararlanma oranı hesaplanmıştır. Araştırmanın 42. gününde her tekerrürden ikişer hayvan olmak üzere her gruptan 12 hayvan kesilmiş ve kan örnekleri alınmıştır. Kesim işleminden sonra iç organlar ayrılmıştır. Karkas ağırlıklarının, kesim öncesi canlı ağırlığa bölünmesiyle karkas randımanı hesaplanmıştır. Kesilen her hayvana ait kanat, sırt-boyun, but, göğüs eti, kalp, karaciğer, dalak, taşlık

ile bursa fabricius ağırlıkları tartımla belirlenmiş ve kesim öncesi canlı ağırlıklara bölünerek oranları belirlenmiştir. Karkaslar +4°C'de 24 saat bekletilmiştir ve daha sonra göğüs etlerinden yeterli miktarda numuneler alınarak buzdolabı poşetleri içerisinde analiz edilinceye kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Göğüs eti kalite parametrelerinden renk, pH, pişirme kaybı, su tutma kapasitesi ve beyaz çizgi skoru değerleri analiz edilmiştir. Kesilen hayvanların derisi sıyrıldıktan sonra göğüs etinde kırmızı renk (a\*), sarı renk (b\*) ve parlaklık (L\*) ölçümleri 3 farklı noktadan 1. saatte ve 24. saatte belirlenmiştir. Tavuk göğüs eti renk yoğunlukları (L\*, a\*, b\*) Lovibond (RT SERIES for MODEL SP60) kolorimetre cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Göğüs eti pH değerleri pH-Metre ile (Mettler Toledo Seven2Go) kesimden sonra 15. dakikada ve 24. saatte olmak üzere iki kez belirlenmiştir.

Pişirme kaybı analizi kesilen hayvanlardan alınan göğüs eti örneklerinde Honikel (1998) tarafından bildirilen metoda göre yapılmıştır. Su tutma kapasitesi analizinde Hamm (1960) tarafından belirtilen basınç metodu kullanılmıştır. Göğüs etleri, kesim işleminden sonra karkastan ayrılarak fotoğrafları çekildi. Çekilen fotoğraflar incelenerek göğüs eti üzerindeki beyaz çizgiler Kuttappan ve ark. (2013)'nin bildirdiği kriterlere göre skorlanmıştır.

Denemeden elde edilen verilerin istatistiki olarak analizi tek yönlü varyans analizi (One Way Anova) ile yapılmıştır. Grup ortalamalarının ikili karşılaştırılmasında Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. İstatistik analizler için SPSS (1999) paket programı kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan rasyonların hammadde bileşimi Tablo 1, Tablo 2 ve Tablo 3'te verilmiştir.

**Tablo 1.** Broiler Başlangıç Rasyonu.

Besin Maddeleri	Kontrol	%0.3 Zen	%0.6 Zen	%0.05 Pro	%0.3 Zen+ %0.05Pro	%0.6 Zen + %0.05Pro
Bitkisel Yağ	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25
Buğday, Kışlık	4.00	4.02	4.00	4.01	4.00	3.98
Mısır, Sarı	50.82	50.53	50.23	50.78	50.47	50.19
Balık Unu,%72 HP	0.85	0.85	0.85	0.83	0.85	0.85
Soya Küspesi,%48HP	38.10	38.10	38.10	38.10	38.10	38.10
Dikalsiyum Fosfat	1.74	1.74	1.74	1.74	1.74	1.74
DL-Methionin	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
Kireç Taşı	1.07	1.07	1.07	1.07	1.07	1.07
L-Lizin	0.16	0.13	0.15	0.16	0.16	0.16
L-Treonin	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Sodyum Bikarbonat	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
Tuz	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
Vitamin-Mineral Karması	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Zencefil		<b>0.30</b>	<b>0.60</b>		<b>0.30</b>	<b>0.60</b>
Probiyotik				<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>

Bir kg karma yemdeki vitamin-mineral değerleri: D3 vitamini 5.000. IU; A vitamini 12.000. IU; E vitamini 50 mg; B1 vitamini 3 mg; B2 vitamini 6 mg; K3 vitamini 4. mg; Niasin 40 mg; Kalsiyum D-pantotenat 15mg; B12 vitamini 0.0 3 mg; B6 vitamini 5 mg; Folik Asit 1 mg; Kolin Klorid 400 mg. Biotin 0.075 mg; C vitamini 50 mg ve antioksidan 10 mg, Demir 40mg; Manganez 120 mg, Çinko 110 mg; Kobalt 0.005 mg; Selenyum 0.003mg, Bakır 16 mg; İyot 0.125 mg.

**Tablo 2.** Broiler Büyütme Rasyonu.

Besin Maddeleri	Kontrol	%0.3 Zen	%0.6 Zen	%0.05 Pro	%0.3 Zen + %0.05Pro	%0.6Zen + %0.05Pro
Bitkisel Yağ	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13
Buğday, Kışlık	5.42	5.42	5.30	5.20	5.36	5.23
Mısır, Sarı	53.80	53.50	53.30	53.89	53.55	53.34
Balık Unu, %72 HP	0.77	0.75	0.74	0.78	0.77	0.77
Soya Küspesi, %48 HP	33.25	33.25	33.28	33.32	33.20	33.24
Dikalsiyum Fosfat	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
DL-Methionin	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Kireç Taşı	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98
L-Lizin	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
L-Treonin	0.05	0.07	0.07	0.05	0.07	0.07
Sodyum Bikarbonat	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
Tuz	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24
Vitamin-Mineral Karması	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Zencefil		<b>0.30</b>	<b>0.60</b>		<b>0.30</b>	<b>0.60</b>
Probiyotik				<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>

Bir kg karma yemdeki vitamin-mineral değerleri: D3 vitamini 5.000. IU; A vitamini 12.000. IU; E vitamini 50 mg; B1 vitamini 3 mg; B2 vitamini 6 mg; K3 vitamini 4. mg; Niasin 40 mg; Kalsiyum D-pantotenat 15mg; B12 vitamini 0.0 3 mg; B6 vitamini 5 mg; Folik Asit 1 mg; Kolin Klorid 400 mg. Biotin 0.075 mg; C vitamini 50 mg ve antioksidan 10 mg, Demir 40mg; Manganez 120 mg, Çinko 110 mg; Kobalt 0.005 mg; Selenyum 0.003mg, Bakır 16 mg; İyot 0.125 mg.

**Tablo 3.** Broiler Bitirme Rasyonu.

Besin Maddeleri	Kontrol	%0.3 Zen	%0.6 Zen	%0.05 Pro	%0.3 Zen +%0.05Pro	%0.6 Zen +%0.05Pro
Bitkisel Yağ	4.20	4.20	4.20	4.20	4.20	4.20
Buğday, Kışık	5.46	5.74	5.74	5.70	5.74	5,70
Mısır, Sarı	57.06	56.66	56.36	56.95	56.61	56,35
Soya Küspesi, %48 HP	29.88	29.70	29.70	29.70	29.70	29.70
Dikalsiyum Fosfat	1.40	1.40	1.40	1.40	1.40	1.40
DL-Methionin	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Kireç Taşı	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91
L-Lizin	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
L-Treonin	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Sodyum Bikarbonat	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
Tuz	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
Vitamin-Mineral	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Karması						
Zencefil		<b>0.30</b>	<b>0.60</b>		<b>0.30</b>	<b>0.60</b>
Probiyotik				<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>

Bir kg karma yemdeki vitamin-mineral değerleri: D3 vitamini 5.000. IU; A vitamini 12.000. IU; E vitamini 50 mg; B1 vitamini 3 mg; B2 vitamini 6 mg; K3 vitamini 4. mg; Niasin 40 mg; Kalsiyum D-pantotenat 15mg; B12 vitamini 0.0 3 mg; B6 vitamini 5 mg; Folik Asit 1 mg; Kolin Klorid 400 mg. Biotin 0.075 mg; C vitamini 50 mg ve antioksidan 10 mg, Demir 40mg; Manganez 120 mg, Çinko 110 mg; Kobalt 0.005 mg; Selenyum 0.003mg, Bakır 16 mg; İyot 0.125 mg.

## Bulgular

Broiler rasyonlarına probiyotik ile zencefil ilavesinin ortalama canlı ağırlık değerleri ve canlı ağırlık artışları Tablo 4 ve Tablo 5' de verilmiştir.

Broiler rasyonlarına probiyotik ile zencefil ilavesinin yem tüketimleri ve yemden yararlanma oranları üzerine etkisi Tablo 6 ve Tablo 7'de verilmiştir.

Broiler rasyonlarına probiyotik ile zencefil ilavesinin karkas parametreleri üzerine etkisi Tablo 8'de verilmiştir.

Broiler rasyonlarına probiyotik ile zencefil ilavesinin iç organ ağırlık yüzdeleri üzerine etkisi Tablo 9'da verilmiştir.

Broiler rasyonlarına probiyotik ile zencefil ilavesini göğüs eti kalite parametreleri renk (L\*, a\*, b\*), pH, su tutma kapasitesi, pişirme kaybı, göğüs eti skor üzerine etkisi Tablo 10 ve Tablo 11'de sunulmuştur.

**Tablo 4.** Deneme Gruplarının Haftalık Ortama Canlı Ağırlıkları (g).

Gruplar	Başlangıç CA	1.Hafta CA	2.Hafta CA	3.Hafta CA	4.Hafta CA	5.Hafta CA	6.Hafta CA
Kontrol	45.45	128.84 <sup>c</sup>	315.79	630.04	990.713 <sup>b</sup>	1518.11 <sup>bc</sup>	2167.59 <sup>b</sup>
%0.3Zen	45.54	138.45 <sup>a</sup>	333.697	633.42	965.52 <sup>b</sup>	1492.70 <sup>c</sup>	2136.89 <sup>b</sup>
%0.6 Zen	46.03	135.75 <sup>ab</sup>	327.577	661.69	1069.00 <sup>a</sup>	1618.37 <sup>ab</sup>	2317.58 <sup>a</sup>
%0.05Pro	44.69	134.66 <sup>abc</sup>	335.607	661.38	1120.18 <sup>a</sup>	1709.09 <sup>a</sup>	2410.64 <sup>a</sup>
%0.05Pro+%0.3Zen	43.66	137.06 <sup>ab</sup>	343.682	672.88	1121.27 <sup>a</sup>	1682.88 <sup>a</sup>	2441.15 <sup>a</sup>
%0.05Pro+%0.6Zen	44.51	130.33 <sup>bc</sup>	331.073	660.09	1121.47 <sup>a</sup>	1686.53 <sup>a</sup>	2392.65 <sup>a</sup>
SEM	0.497	1.002	3.051	5.833	14.637	19.700	26.032
P	0.525	<b>0.021</b>	0.165	0.192	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>

Pro:Probiyotik katkısı, Zen:Zencefil katkısı, Pro+Zen:Probiyotik ve zencefil kombinasyonlarının katkısı, CA:Canlı ağırlık, (P<0.05):Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir, (P>0.05): Önemsiz, SEM: Ortalamanın standart hatası.

**Tablo 5.** Deneme Gruplarının Haftalık Ortama Canlı Ağırlık Artışları (g).

Gruplar	1.Hafta CAA	2.Hafta CAA	3.Hafta CAA	4.Hafta CAA	5.Hafta CAA	6.Hafta CAA	1-6. Hafta CAA
Kontrol	83.39 <sup>c</sup>	186.95	314.25	360.66 <sup>bc</sup>	527.40	649.48 <sup>b</sup>	2122.14 <sup>b</sup>
%0.3Zen	92.91 <sup>ab</sup>	195.24	299.73	332.10 <sup>c</sup>	527.17	644.19 <sup>b</sup>	2091.35 <sup>b</sup>
%0.6Zen	89.73 <sup>abc</sup>	191.82	334.12	407.30 <sup>ab</sup>	549.37	699.21 <sup>ab</sup>	2271.55 <sup>a</sup>
%0.05Pro	89.97 <sup>abc</sup>	200.94	325.77	458.81 <sup>a</sup>	588.91	701.55 <sup>ab</sup>	2365.95 <sup>a</sup>
%0.05Pro+%0.3Zen	93.39 <sup>a</sup>	206.62	329.20	448.38 <sup>a</sup>	561.61	758.27 <sup>a</sup>	2397.49 <sup>a</sup>
%0.05Pro+%0.6Zen	85.82 <sup>bc</sup>	200.74	329.02	461.38 <sup>a</sup>	565.06	706.11 <sup>ab</sup>	2348.13 <sup>a</sup>
SEM	1.052	2.484	3.829	11.026	7.235	10.932	26.121
P	<b>0.026</b>	0.234	0.084	<b>0.000</b>	0.094	<b>0.018</b>	<b>0.000</b>

Pro:Probiyotik katkısı, Zen:Zencefil katkısı, Pro+Zen:Probiyotik ve zencefil kombinasyonlarının katkısı CAA:Canlı ağırlık artışı, (P<0.05):Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir, (P>0.05): Önemsiz, SEM: Ortalamanın standart hatası.

**Tablo 6.** Deneme Gruplarının Haftalık Ortama Yem Tüketimleri (g).

Gruplar	1.Hafta YT	2.Hafta YT	3.Hafta YT	4.Hafta YT	5.Hafta YT	6.Hafta YT	1-6. Hafta YT
Kontrol	135.57	353.12	633.14	843.52	1084.72 <sup>a</sup>	1290.46	4340.55 <sup>a</sup>
%0.3Zen	131.09	291.67	546.97	684.07	897.41 <sup>c</sup>	1144.89	3696.10 <sup>b</sup>
%0.6Zen	127.61	300.76	565.91	721.85	936.11 <sup>bc</sup>	1174.91	3827.14 <sup>b</sup>
%0.05Pro	131.88	313.79	583.33	728.89	1002.41 <sup>ab</sup>	1176.85	3937.15 <sup>b</sup>
%0.05Pro+%0.3Zen	128.23	290.98	572.19	743.31	965.23 <sup>bc</sup>	1214.96	3914.92 <sup>b</sup>
%0.05Pro+%0.6Zen	125.70	302.80	591.89	727.65	960.79 <sup>bc</sup>	1242.55	3951.38 <sup>b</sup>
SEM	1.580	9.963	12.807	18.366	15.081	15.044	55.689
P	0.544	0.498	0.522	0.208	<b>0.003</b>	0.050	<b>0.016</b>

**Pro:**Probiyotik katkısı, **Zen:**Zencefil katkısı, **Pro+Zen:**Probiyotik ve zencefil kombinasyonlarının katkısı, **YT:**Yem tüketimi, (**P<0.05**):Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir, (**P>0.05**): Önemli değil, **SEM:** Ortalamanın standart hatası.

**Tablo 7.** Broiler Rasyonlarına Probiyotik ile Zencefil İlavesinin Yemden Yararlanma Oranı Üzerine Etkisi.

Gruplar	1.Hafta YYO	2.Hafta YYO	3.Hafta YYO	4.Hafta YYO	5.Hafta YYO	6.Hafta YYO	1-6.Hafta YYO
Kontrol	1.64	1.91	2.03	2.48 <sup>a</sup>	2.11	2.01	2.08 <sup>a</sup>
%0.3Zen	1.41	1.51	1.83	2.09 <sup>ab</sup>	1.70	1.78	1.77 <sup>b</sup>
%0.6Zen	1.42	1.56	1.70	1.78 <sup>b</sup>	1.71	1.68	1.68 <sup>b</sup>
%0.05Pro	1.47	1.57	1.80	1.60 <sup>b</sup>	1.71	1.70	1.67 <sup>b</sup>
%0.05Pro+%0.3Zen	1.38	1.42	1.74	1.67 <sup>b</sup>	1.72	1.61	1.64 <sup>b</sup>
%0.05Pro+%0.6Zen	1.48	1.53	1.81	1.60 <sup>b</sup>	1.71	1.76	1.69 <sup>b</sup>
SEM	0.028	0.064	0.051	0.095	0.047	0.039	0.043
P	0.128	0.334	0.533	<b>0.031</b>	0.064	0.050	<b>0.021</b>

**Pro:**Probiyotik katkısı, **Zen:**Zencefil katkısı, **Pro+Zen:**Probiyotik ve zencefil kombinasyonlarının katkısı, **YYO:**Yemden yararlanma oranı, (**P<0.05**):Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir, (**P>0.05**): Önemli değil, **SEM:** Ortalamanın standart hatası.

**Tablo 8.** Broiler Rasyonlarına Probiyotik ile Zencefil İlavesinin Karkas Parametreleri Üzerine Etkisi.

Gruplar	Kesim Ağırlık (g)	Karkas Randımanı%	Kanat %	Sirt+ Boyun %	But %	Göğüs %
Kontrol	2590.33 <sup>b</sup>	72.68	7.69	10.11	32.90	21.90 <sup>b</sup>
%0.3Zen	2308.90 <sup>c</sup>	71.70	7.49	9.40	32.41	22.93 <sup>ab</sup>
%0.6Zen	2421.16 <sup>c</sup>	73.67	13.60	9.43	33.16	24.12 <sup>ab</sup>
%0.05Pro	2784.58 <sup>a</sup>	70.38	6.99	9.45	33.06	24.87 <sup>a</sup>
%0.05Pro+%0.3Zen	2650.58 <sup>ab</sup>	73.16	6.91	9.85	32.63	24.59 <sup>a</sup>
%0.05Pro+%0.6Zen	2618.00 <sup>b</sup>	73.426	6.82	10.11	32.16	24.21 <sup>a</sup>
SEM	27.355	0.634	0.079	0.112	0.161	0.274
P	<b>0.000</b>	0.653	1.131	0.333	0.444	<b>0.034</b>

**Pro:**Probiyotik katkısı, **Zen:**Zencefil katkısı, **Pro+Zen:**Probiyotik ve zencefil kombinasyonlarının katkısı, (**P<0.05**):Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir, (**P>0.05**): Önemli değil, **SEM:** Ortalamanın standart hatası.

**Tablo 9.** Broiler Rasyonlarına Probiyotik ile Zencefil İlavesinin İç Organ Ağırlık Yüzdeleri Üzerine Etkisi.

Gruplar	Karaciğer (%)	Kalp (%)	Dalak (%)	Bursa Fabricus (%)
Kontrol	1.95	0.41	0.09	0.06
%0.3Zen	2.02	0.39	0.08	0.06
%0.6Zen	2.13	0.39	0.09	0.05
%0.05Pro	1.98	0.39	0.09	0.07
%0.05Pro+%0.3Zen	1.99	0.45	0.10	0.05
%0.05Pro+%0.6Zen	2.02	0.40	0.09	0.06
SEM	0.035	0.006	0.003	0.004
P	0.811	0.059	0.417	0.504

**Pro:**Probiyotik katkısı, **Zen:**Zencefil katkısı, **Pro+Zen:**Probiyotik ve zencefil kombinasyonlarının katkısı, (**P<0.05**):Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir, (**P>0.05**): Önemli değil, **SEM:** Ortalamanın standart hatası.

**Tablo 10.** Broiler Rasyonlarına Probiyotik ile Zencefil İlavesinin Göğüs Eti Renk Parametreleri.

Gruplar	L (15)	a*(15)	b*(15)	L(24)	a*(24)	b*(24)
Kontrol	44.80	-1.37 <sup>b</sup>	1.30	50.49 <sup>d</sup>	.28	3.46 <sup>ab</sup>
%0.3Zen	43.70	-1.23 <sup>b</sup>	1.43	53.10 <sup>ab</sup>	.27	2.91 <sup>bc</sup>
%0.6Zen	44.85	-1.92 <sup>b</sup>	0.86	52.67 <sup>bc</sup>	-.54	3.68 <sup>a</sup>
%0.05Pro	44.03	-.80 <sup>ab</sup>	1.19	52.13 <sup>bc</sup>	-.49	2.79 <sup>bc</sup>
%0.05Pro+%0.3Zen	44.27	-.89 <sup>ab</sup>	0.98	54.43 <sup>a</sup>	-.20	2.53 <sup>c</sup>
%0.05Pro+%0.6Zen	44.73	-.030 <sup>a</sup>	0.83	51.33 <sup>cd</sup>	-.47	2.95 <sup>bc</sup>
SEM	0.227	0.164	0.127	0.250	0.160	0.104
P	0.623	<b>0.024</b>	0.709	<b>0.000</b>	0.462	<b>0.009</b>

**Pro:**Probiyotik katkısı, **Zen:** Zencefil katkısı, **Pro+Zen:**Probiyotik ve zencefil kombinasyonu; **a\*:** Kırmızı renk koordinatı; **b\*:** Sarı renk koordinatı; **L\*:** Parlaklık, (**P<0.05**):Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir, (**P>0.05**): Önemli değil, **SEM:** Ortalamanın standart hatası, **15:**Kesimden sonra 15.dakika, **24:** Kesimden sonra 24. Saat.

**Tablo 11.** Broiler Rasyonlarına Probiyotik ile Zencefil İlavesinin Göğüs Eti Kalite Parametreleri.

Gruplar	pH (15)	pH (24)	Su Kapasitesi (%)	Tutma (%)	Pişirme Kaybı (%)	Beyaz Skoru	Çizgi
Kontrol	5.93	5.83 <sup>bc</sup>	23.20 <sup>a</sup>		32.57 <sup>bc</sup>	1.04	
%0.3Zen	6.13	5.79 <sup>c</sup>	22.65 <sup>a</sup>		37.38 <sup>a</sup>	0.83	
%0.6Zen	6.09	5.83 <sup>bc</sup>	21.64 <sup>ab</sup>		32.82 <sup>bc</sup>	1.33	
%0.05Pro	5.89	5.91 <sup>a</sup>	20.60 <sup>b</sup>		31.43 <sup>c</sup>	1.12	
%0.05Pro+%0.3Zen	5.95	5.89 <sup>ab</sup>	22.85 <sup>a</sup>		33.43 <sup>b</sup>	1.08	
%0.05Pro+%0.6Zen	6.12	5.89 <sup>ab</sup>	22.20 <sup>ab</sup>		32.74 <sup>bc</sup>	1.33	
SEM	0.030	0.010	0.251		0.302	0.064	
P	0.053	<b>0.006</b>	<b>0.038</b>		<b>0.000</b>	0.205	

**Pro:**Probiyotik katkısı, **Zen:**Zencefil katkısı, **Pro+Zen:**Probiyotik ve zencefil kombinasyonu; **SEM:** Ortalamanın standart hatası, (**P<0.05**):Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir, (**P>0.05**): Önemli değil, **15:**Kesimden sonra 15.dakika, **24:** Kesimden sonra 24. Saat.

## Tartışma

Broiler rasyonlarına probiyotik ile zencefil ilavesinin araştırmanın başlangıcından deneme sonuna kadarki dönemde canlı ağırlık ve canlı ağırlık artışı değerlerine etkisi Tablo 4 ve 5 incelendiğinde %0.3 zencefil ilavesinin canlı ağırlık ve canlı ağırlık artışı üzerine etkisinin olmadığı ( $P>0.05$ ), %0.6 zencefil, %0.05 probiyotik katkı maddesi, %0.05 probiyotik + %0.3 zencefil ile %0.05 probiyotik + %0.6 zencefil kombinasyonlarının olduğu gruplarda ise canlı ağırlık ve canlı ağırlık artışının arttığı gözlenmiştir ( $P<0.05$ ). Tüm deneme grupları içerisinde en yüksek CA (2441.15) ve CAA değeri (2397.49) %0.05 probiyotik + %0.3 zencefil ilave edilen grupta tespit edilmiştir. Probiyotik kullanımı ile birlikte laktik asitten yararlanma yükselmekte, laktik asitten ise propiyonik asit üretimi artmakta ve sonuç olarak rasyon enerjisinden daha fazla yararlanılmaktadır (Karademir 2003). Bu araştırmanın bulgularına benzer olarak bazı araştırmacılar (Çelik ve ark., 2007; Jin ve Ho, 2000) broiler karma yemlerine probiyotik ilavesinin canlı ağırlığı önemli derecede artırdığını kaydetmişlerdir. Mevcut çalışmadan farklı olarak Panda ve ark. (2000), 0-42 günlük dönem için karma yemlere ilave ettikleri probiyotiklerin broilerin canlı ağırlık üzerine bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda ortaya çıkan bu farklılıklara çalışmalarda kullanılan

probiyotik miktarı, probiyotik türü veya hayvan materyali neden olabileceği düşünülmektedir.

Deneme gruplarının deneme başlangıcından deneme sonuna kadar (1-6. hafta) kontrol grubuna kıyasla probiyotik, zencefil ve probiyotik+zencefil kombinasyonlarının (%0.05 probiyotik + 0.6 zencefil ile %0.05 probiyotik + 0.3 zencefil) ilavesinin yem tüketimini ve yemden yararlanma oranını düşürdüğü belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Yapılan bu çalışma da gözlenen yem tüketimindeki düşüşün zencefilin yapısında bulunan ve acılık hissi veren *gingerol* ve zingeron gibi polifenolik maddelerin iştahı azaltmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Baliga, 2011). Yemden yararlanma oranında gözlemlenen iyileşme ise probiyotik bakterilerin bağırsak epitel hücrelerine tutunarak hızlı bir şekilde çoğaldığı, bağırsakların doğal konakçısı olmayan ve hastalık yapan patojenlerin bağırsak yüzeyinde tutunmalarını ve çoğalmalarını engellediği bunun sonucu olarak probiyotiklerin, hastalıkları önleyerek bağırsak florasının normale dönmesini ve hayvanın sağlıklı şekilde gelişmesini sağlayarak hayvanlara canlı ağırlık kazandırdığı bildirilmiştir (Atılğan ve Çiçek, 2021; Bahadıroğlu, 1997). Broiler rasyonlarına zencefil ilavesinin etlik piliçler üzerindeki etkisini inceleyen Rafiee ve ark. (2014), %0.2 oranında zencefil katkı maddesinin yemden yararlanma oranını iyileştirdiğini bildirmişlerdir.

Tablo 8 incelendiğinde broiler rasyonlarına probiyotik ile zencefil ilavesinin karkas randımanı, karkas ağırlığı, kanat, sırt-boyun, but ağırlık yüzdelerine etkisi önemsizken ( $P>0.05$ ), kesim ağırlığı ve göğüs ağırlık yüzdeleri bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ). %0.3 zencefil ve %0.6 zencefil katkısının ise kontrol grubuna kıyasla kesim ağırlığını düşürdüğü, probiyotik ve probiyotik+zencefil kombinasyonlarının ise kesim ağırlığını arttırdığı belirlenmiştir. Zencefil katkı maddesinin kesim ağırlığında meydana gelen düşüş zencefilin yapısında bulunan gingerol ve zingeron gibi polifenolik maddelerin acı tadı nedeniyle iştahı azaltmasına bağlı olarak yem tüketiminin ve canlı ağırlık kazancının düşmesine bağlanabilir. Probiyotik katkısının ve probiyotik+zencefil kombinasyonlarının göğüs ağırlık yüzdesini arttırdığı gözlemlenmiştir. Göğüs ağırlığında meydana gelen artışın ise canlı ağırlık artışına paralel olarak arttığı kanısına varılmıştır. Sunulan çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde çok sayıda araştırma etlik piliç yemlerine probiyotik katkısının karkas ağırlığı ve randımanı bakımından gruplar arasında herhangi bir farklılığa neden olmadığını göstermiştir (Ergün, 2000; Ocak ve ark., 2008; Sadeghi, 2011).

Tablo 9 incelendiğinde karaciğer, kalp, dalak ve bursa fabricus ağırlık yüzdesi açısından gruplar arasında istatistiki olarak farklılık tespit edilmemiştir ( $P>0.05$ ). Benzer şekilde yapılan çalışmalarda broiler rasyonlarına probiyotik ve zencefil ilavesinin iç organ ağırlık yüzdesine etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Rafiee ve ark., 2014; Tekeli 2006).

Tablo 10 incelendiğinde kesim esnasında incelenen göğüs eti renk parametrelerinden  $L^*$  ve  $b^*$  değerleri bakımından gruplar arasında farklılıklar tespit edilmemişken,  $a^*$  değerlerinde probiyotik ve probiyotik+zencefil katkılarının ilavesine bağlı olarak broilerlerde diğer deneme gruplarına kıyasla farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Kesimden 24 saat sonra incelenen göğüs eti  $a^*$  değerlerinde farklılıklar tespit edilmemişken,  $L^*$  ve  $b^*$  değerlerinde farklılıklar tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ). Zencefil ve probiyotik+zencefil katkılarının 24. saat  $L^*$  değerini değiştirdiği, zencefil ve probiyotik katkılarının ise 24. saat  $b^*$  değerlerini değiştirdiği belirlenmiştir. Göğüs eti broilerlerde renk değişimlerine hassastır. Yağların oksidasyonu sonucu oluşan ürünlerin göğüs etindeki myoglobin oksidasyonunu arttırarak  $a^*$  (kırmızılık) değerini düşürdüğü,  $b^*$  (sarılık) değerini arttırdığı gözlemlenmiştir. Gözlemlenen bu renk farklılıklarının rasyonda bulunan  $\beta$ -karotenoid düzeyinin fazlalığından kaynaklandığı bildirilmiştir (Diktaş, 2011; Laçın ve ark., 2013). Etin lezzeti, rengi, tekstürü ve kokusu et kalitesini belirleyen önemli parametrelerdendir. Tüketicilerin et tercihleri genel olarak özellikle etin rengi ve kokusu olmak üzere yumuşaklığı, sululuğu ve tadı gibi duyuşal özellikleri tarafından belirlenir (Yenice ve ark., 2016). Mevcut çalışma sonuçları, broiler yemlerine probiyotik ilavesinin etin  $a^*$  (kırmızılık) değerini düşürdüğünü,  $b^*$  (sarılık) değerini arttırdığını bildiren Karaoğlu ve ark.'nın (2006) sonuçlarından farklılık göstermiştir.

Tablo 11 incelendiğinde %0.05 probiyotik ilavesinin kesimden 24 saat sonra ölçülen pH değerini yükselttiği, su tutma kapasitesini ve pişirme kaybını düşürdüğü

belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Kanatlı etlerinde pH;  $\leq 5.8$  su salan, yumuşak, solgun 5.9–6.2 standart et,  $\geq 6.3$  koyu olarak değerlendirilmektedir (Özhan ve ÜG, 2015). %0.05 probiyotik katkısı etin pH değerini yükseltse de gözlenen pH değerleri standart et değerleri arasında bulunmaktadır (Özhan ve ÜG, 2015). Pelicano ve ark. (2003), farklı probiyotik (*Lactobacillus johnsonii*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus reuteri*, *Bacillus licheniformis*) ilaveli yemlerle beslenen broilerlerde göğüs eti pişirme kaybı açısından gruplar arasında fark olmadığını bildirmiştir. Kanatlı hayvanlarda yem ve besleme et karkas kalitesini etkileyen faktörlerden birisidir. Kanatlı hayvanların yeminde temel enerji kaynağı olan bitkisel veya hayvansal yağlar, dane yemler, kimyasal kompozisyonlarına bağlı olarak, yem katkıları ise etki mekanizmalarına göre et kalitesini etkilemektedirler. Kaliteli et üretiminin kaliteli hammaddeden üretilen karma yem ile dengeli besleme yoluyla mümkün olduğu bildirilmiştir (Kutlu ve ark., 1999). Yapılan bu çalışma ile literatürlerde bildirilen pH değerleri, et rengi, su tutma kapasitesi ve pişirme kaybı ile ilgili parametreler bakımından gözlenen farklı sonuçlar kullanılan yem ile katkı maddelerinin çeşidi, yetiştirme yöntemleri, mevsim, çevre ve deneme süresindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir.

## Sonuç

Bu çalışma, deneme başlangıcından deneme sonuna kadar kullanılan %0.05 probiyotik katkı maddesi ilavesinin canlı ağırlık ve canlı ağırlık artışını arttırdığı, yemden yararlanma oranını iyileştirdiği, kesim ağırlığı ve göğüs ağırlık yüzdesini arttırdığı, göğüs eti su tutma kapasitesini ve pişirme kaybını düşürdüğü ancak iç organ ağırlığı üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Probiyotik+zencefil kombinasyonlarının %0.05 probiyotik + %0.3 zencefil katkısı ile %0.05 probiyotik + %0.6 zencefil kombinasyonlarının canlı ağırlık, canlı ağırlık artışını ve göğüs ağırlık yüzdesini arttırdığı, yem tüketimini düşürdüğü, yemden yararlanma oranını iyileştirdiği ve iç organ ağırlıkları üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak broiler rasyonlarına %0.05 probiyotik ilavesinin besi performansını iyileştirdiği ekonomik ve uygulanabilir olması nedeniyle broiler rasyonlarında kullanımının önerilebileceği kanısına varılmıştır.

## Çıkar çatışması

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

## Etik izin

Bu çalışma 17/12/2020 tarihli 49512 sayılı Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HRÜ-HADYEK) 2020/006/08 kararı ile "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 8 (k) gereği HADYEK iznine tabi değildir.

## Benzerlik Oranı

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

## Finansal destek

Bu çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No:21023.

## Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: NK, FB  
Tasarım: NK, FB, MA  
Denetleme/Danışmanlık: FB, MOA  
Veri Toplama ve/veya İşleme: NK, FB,  
Analiz ve/veya Yorum: NK, FB, MA, MOA  
Kaynak Taraması: NK, FB  
Makalenin Yazımı: NK, FB  
Eleştirel İnceleme: NK, FB, MA, MOA

## Kaynakça

- AOAC. Official Methods of Analysis. 18th edn. Association of Official Analytical Chemists; Arlington, VA, USA: 2005.
- Atılğan C, Çiçek ŞK, 2021: Hayvanların Beslenmesinde Probiyotik ve Prebiyotiklerin Önemi ve Sağlık Üzerine Etkileri. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Derg* 10 (2), 24-35.
- Bahadıroğlu E, 1997: Aviguard (Doğal Sindirim Sistemi Florası). *Hayvancılık Yan Sanayi ve Vet Hek Derg*, 17 (1):5-8.
- Baliga MS, Hanıadka RV, Pereira MM, Dsouza JJ, Pallaty PL, Bhat HP, Popuri S, 2011: Update on The Chemopreventive Effects of Ginger and Its Phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51: 499–523.
- Bayar FU, 2020: Doğadan gelen mucize: Zencefil (*Zingiber officinale*). *Bahçe*, 49 (2), 99-110.
- Carpenter KJ and Clegg KM, 1956: The Metabolizable Energy of Poultry Feding stuffs İn Re/Ation Ro Their Chemical Composition. *J. Sei Food Agrie*, 7, 45-51.
- Çelik K, Mutluay M and Uzatici A, 2007: Effects of Probiotic and Organic Acid on Performance and Organ Weights İn Broiler Chicks. *Archiva Zootechnica*, 10, 51-56.
- Diktaş M, 2011: Alternatif Bir Üretim Modeli Olarak Buğday Anızında Etlik Piliç Yetiştiriciliği. Yüksek Lisans tezi, *GÜ Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat.
- Doğan Daş B, Daş A, Koyuncu İ, Bilal O, Çetin M, Kırar N ve Şengül AY, 2020: Bildircin Rasyonlarına Nane Yağı İlavesinin Besi Performansı, Et Kalitesi, Karkas Kompozisyonu ve Oksidatif Stres Belirleyicileri Üzerine Etkisi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Derg*, 7 (1), 186-194.
- El-Hack ME, Alagawany M, Shaheen H, Samak D, Othman SI, Allam AA, Taha AE, Khafaga AF, Arif M, Osman A, El Şeyh AI, Elnesr SS, Sitohy M, 2020: Ginger and Its Derivatives as Promising Alternatives to Antibiotics in Poultry Feed. *Animals*, 10 (3), 452.

- Ergün A, 2000: Broyler Rasyonlarında Probiyotik ve Zinc Bacitracin Kullanımı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 47 (03), 271-280.
- Gökmen SA, Sevim B, Curabay B, Ünal K, Cufadar Y and Bahtiyarca Y, 2022: Effect of Ginger (*Zingiber officinale*) Addition to the Diet on Performance, Serum Parameters and Meat Quality in Male Japanese Quails (*Coturnix coturnix Japonica*). *TURJAF Science and Technology*, 10 (3), 419-425.
- Göktaş Ö, Gıdık B, 2019: Tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanım alanları. *Bayburt Üniv Fen Bilimleri Derg*, 2 (1), 145-151.
- Hamm R, 1960: Biochemistry of Meat Hydration. *Adv Food Nutr*, 10 (2), 355- 463.
- Honikel KO, 1998: Reference Methods For The Assessment of Physical Characteristics of Meat *Meat Sci*, 49 (4), 447-457.
- Jernigan MA, Miles RD, Arafa AS, 1985: Probiotics in Poultry Nutrition A Review1. *Worlds Poult Sci J*, 41 (2), 99-107.
- Jin LZ, HO YW, Abdullah N, Jalaludin S, 2000: Digestive and Bacterial Enzyme Activities in Broiler Fed Diets Supplemented with Lactobacillus Cultures. *Poultry Sci*, 79, 886-891.
- Karademir G, Karademir B, 2003: Yem Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Biyoteknolojik Ürünler. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 43, 61-74.
- Karaoğlu M, Aksu MI, Esenbuga N, Macit M, Durdağ, H, 2006: pH and Colour Characteristics of Carcasses of Broilers Fed With Dietary Probiotics and Slaughtered At Different Ages. *AJAS*, 19 (4), 605-610.
- Kırar N, Bilal O, Aydın D. Koyuncu İ, Mehmet A, Bozkaya F, Tufan T, 2020: Bildircin Rasyonlarına Farklı Oranlarda Sumak (*Rhus Coriaria L.*) İlavesinin Besi Performansı, Oksidatif Stres Parametreleri ve Et Kalitesi Üzerine Etkisi. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 9 (2):177-182.
- Kutlu HR, Ünsal İ, Ayaşan T, 1999: Etlik Piliç Üretiminde Et Kalitesi ve Et Kalitesini Etkileyen Faktörler. *Çiftlik Dergisi*, 179, 59-74.
- Kuttappan VA, Shivaprasad HL, Shaw DP, Valentine BA, Hargis BM, Clark FD, McKee SR, Owens SM, 2013: Pathological Changes Associated with White Striping in Broiler Breast Muscles. *Poultry Sci*, 92 (2), 331-338.
- Laçın E, Çoban Ö, 2013: Muhammet A, Sabuncuoğlu N, Hüseyin D. Farklı Yerleşim Sıklığı ve Aydınlatma Programlarının Broyler Etlerinde Renk, pH ve Tbars Değerleri Üzerine Etkisi. *Atatürk Üniv Vet Bilim Derg*, 8, 192-201.
- National Research Council, 1994. Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Ocak N, Erener G, Ak BF, Sungu M, Altop A, Ozmen A, 2008: Performance of Broilers Fed Diets Supplemented with Dry Peppermint (*Mentha Piperita L.*) or Thyme (*Thymus Vulgaris L.*) Leaves as Growth Promoter Source. *Czech J Anim Sci*, 53 (4), 169.
- Özhan N, Şimşek ÜG, 2015: Kafes Sisteminde Yetiştirilen Etlik Piliçlerde Sürü Büyüklüğünün Performans, Bazı Kan ve Kemik Parametreleri, *Musculus Pectoralis* pH Düzeyi ve Karkas Kusurları Üzerine Etkisi. *FÜ Sağlık Bil Vet Derg*, 29, 1-8.

- Panda AK, Reddy MR, Ramarao SV, Praharaj NK, 2000: Effect of Dietary Supplementation of Probiotic on Performance and Immune Response of Layers in Decline Phase of Production. *Indian J Poult Sci*, 35, 102-104.
- Pelicano ERL, De Souza PA, De Souza HBA, Oba A, Norkus EA, Kodawara LM, De Lima TMA, 2003: Effect of Different Probiotics on Broiler Carcass and Meat Quality. *Braz J Poult*, 5, 207-214.
- Rafiee A, Kheiri F, Rahimian Y, Faghanı M, Valiollahı MR, Mırı Y, 2014: The Effect of Ginger Root (*Zingiber officinale*) And Cumin (*Cuminum cyminum*) Powder on Performance, Some Haematological Traits and İntestinal Morphology of Broiler Chicks. *ROAV Sci*, 4 (2),96-100.
- Rahman H, Karuppaiyan Y, Kishore K, Denzongpa R, 2009: Traditional Practices of Ginger Cultivation in Northeast India. *IJTK*, 8 (1), 23-28.
- Sadeghi GH, Karimi A, Jahromi SP, Aziz T, Daneshmand A, 2011: Effect of Cinnamon, Thyme and Turmeric İnfusions on The Performance and İmmune Response İn of 1 to 21 Day-Old Male Broilers. *Braz J Poult*, 14 (1),15-20.
- Sevim B, Gökmen SA, Curabay B, Cufadar Y, Ayaşan T, Bahtiyarca Y, 2021: Japon bıldırcınlarının (*Coturnix coturnix Japonica*) karma yemlerine farklı düzeylerde biberiye (*Rosmarinus officinalis L.*) esansiyel yağ katkısının performans, serum ölçütleri ve üreme hormonları üzerine etkisi. *OKÜ Fen Bil Enst Derg*, 4 (1), 102-109.
- Sitoilova I, Krastanov A, Stoyanova A, Denev P, Gargoca S, 2007: Antioxidant Activity of a Ginger Extract (*Zingiber officinale*). *Food Chem*, 102, 764–770.
- SPSS A. (1999). SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 8 for Windows.
- Tekeli A, Çelik L, Kutlu HR, Görgülü M, 2006: Effect of Dietary Supplemental Plant Extracts on Performance, Carcass Characteristics, Digestive System Development, İntestinal Microflora and Some Blood Parameters of Broiler Chicks. Proceedings of 12th European Poultry Conference, Verona, Italy, pp.307-308.
- Vanbelle N, Teller E, Focant M, 1990: Probiotics in Animal Nutrition. A Review. *Arch Anim Nutr*, 40, 543-567.
- Yenice G, Özlü H, Urçar S, Atasever M, Atasever MA, 2016: Kefirin Broiler Etinin Bazı Mikrobiyolojik ve Fizikokimyasal Özelliklerine Etkisi. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 13, 195-200.
- Yılmaz G, 2021: Probiyotik Bakterilerin Mezenkimal Kök Hücreler Üzerindeki İmmünomodülatör Etkilerinin Araştırılması Yüksek Lisans tezi, NEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.



**Kınalı Keklik (*Alectoris chukar*) Sirinks'inde Desmin, Vimentin ve Laminin Lokalizasyonu**Bayram BAYRAM<sup>1,a,\*</sup>, Uğur TOPALOĞLU<sup>2,b</sup>, Nurşin AYDIN<sup>2,c</sup>, Fatma ÇELENK<sup>3,d</sup>

<sup>1</sup>Şırnak Üniversitesi, İdil Meslek Yüksekokulu, Laborant ve Veteriner Sağlık, Şırnak, Türkiye.

<sup>2</sup>Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye.

<sup>3</sup>Diyarbakır İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, Gıda ve Yem Şube Müdürlüğü, Diyarbakır, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-5738-918X

<sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-8306-491X

<sup>c</sup>ORCID: 0000-0003-0265-3163

<sup>d</sup>ORCID: 0000-0002-9677-8372

**Geliş Tarihi:** 16.01.2023

**Kabul Tarihi:** 26.05.2023

**Bu makale Nasıl kaynak gösterilir:** Bayram B, Topaloğlu U, Aydın N, Çelenk F. (2023). Kınalı Keklik (*Alectoris chukar*) Sirinks'inde Desmin, Vimentin ve Laminin Lokalizasyonu. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 67-74, DOI:10.31196/huvfd.1233665

**\*Yazışma adresi:** Bayram BAYRAM

Şırnak Üniversitesi İdil Meslek Yüksekokulu Laborant ve Veteriner Sağlık, Şırnak, Türkiye.

e-mail: [b.bayram@sirnak.edu.tr](mailto:b.bayram@sirnak.edu.tr)

Online erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Özet:** Kuşlarda sesin yaşamlarındaki önemi günümüze kadar birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Bununla ilgili yapılan geniş çaplı çalışmalar erkeğin ötüşünün dişinin karar kılmasında önemli etkileri olduğunu, erkeğin muhtemel hormonal durumu ve fiziksel gücü hakkında bilgi veriyor olabileceğini, bu durumun dişinin eş seçiminde karar kılmada etkili olabileceğini düşündürmektedir. Memelilerdeki gibi larinks bulunmasına karşın kuşlar şarkılarını söylemek için göğüslerinin derinliklerine yerleşmiş trakea ve akciğerler arasında lokalize olan sirinks kullanılmaktadır. Çalışmamızın amacı, desmin, vimentin ve laminin'in sirinks üzerine olası etkilerini araştırmaktır. Bu kapsamda sirinks'in epitel dokusu, kas dokusu, kıkırdak dokusu ve bezleri incelenmiş ve bu filamanların varlıkları histolojik olarak immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Yapılan incelemeler sonucu desmin, vimentin ve laminin'in erkek ve dişi kınalı keklikler arasında değişkenlik göstermediği tespit edildi. Desmin ve vimentin'in düz kas hücrelerinde orta yoğunluklu bir reaksiyon gösterdiği görüldü. Laminin'in kaslarda güçlü reaksiyonlar gösterdiği; bezlerde, epitelyum hücrelerinde ve damar duvarlarında da güçlü reaksiyonlar gösterdiği görüldü. Elde edilen bu verilerden yola çıkarak bu intermediyer filamanların, keklik sirinksindeki hücre gruplarının iskelet yapısına katılarak hücrelerdeki homeostazının sağlanmasında ve organın fonksiyon gördüğü fizyolojik süreçlerin devamlılığında etkileri olduğunu söyleyebiliriz.

**Anahtar Kelimeler:** Desmin, Keklik, Laminin, Sirinks, Vimentin.

**Localization of Desmin, Vimentin, and Laminin in the Syrinx of the Chukar Partridge (*Alectoris chukar*)**

**Abstract:** The importance of vocalizations in the lives of birds has attracted the attention of many researchers to date. Extensive studies on this subject suggest that the male's song has essential effects on the female's decision-making, that it may provide information about the male's possible hormonal status and physical strength, and that this may be effective in deciding the female's choice of mate. Although they have a larynx like mammals, birds use the syrinx, localized deep in the chest between the trachea and lungs, to sing. Our study aimed to investigate the possible effects of desmin, vimentin, and laminin on the syrinx. In this context, epithelial tissue, muscle tissue, cartilage tissue, and glands of the syrinx were examined, and the presence of these filaments was histologically investigated using immunohistochemical methods. It was determined that desmin, vimentin, and laminin did not vary between male and female partridges. Desmin and vimentin showed a moderate-intensity reaction in smooth muscle cells. Laminin showed strong reactions in muscles; it also showed strong reactions in glands, epithelial cells, and vessel walls. Based on these findings, we can say that these intermediary filaments participate in the cytoskeletal structure of cell groups in the partridge syrinx, maintaining homeostasis in the cells and the physiological processes by which the organ functions.

**Keywords:** Desmin, Laminin, Partridge, Syrinx, Vimentin.

## Giriş

Kuşların evriminde; tüyler, uçuş ve ötüş gibi birtakım özellikler kilit rol oynamıştır (Kingsley ve ark., 2018). Pek çok kuşun melodik çağrısı, göğüslerinin derinliklerinde yerleşmiş sirinks adı verilen ve türünün tek örneği olan ses kutusundan gelir. Araştırmacılar, bu ses kutusunun yalnızca bir kez evrimleştiğini ve bu yapının da evrimin nadir bir örneği olduğunu bildirmişlerdir. Tüm kuş türlerinde, memelilerdeki gibi larinks bulunmasına karşın bu türler şarkılarını söylemek için trakea ve akciğerler arasında lokalize olan sirinks kullanmaktadırlar (Riede ve Goller, 2010a; Riede ve ark., 2019). Ayrıca kuşlarda sirinks; cinsiyet tayini, kuş türlerinin sınıflandırılması, çiftleşme davranışları ve filogenetik konumlarının belirlenmesinde de fayda sağlamaktadır. Sirinks, farklı kuş türleri arasında morfolojik olarak ve yapısına katkıda bulunan kıkırdak halkalarının doğasına göre trakeal, bronşiyal ve trakeobronşiyal tiplere ayrılır. Trakeobronşiyal tip, çoğu kuşta en sık gözlenen tiptir (Baumel, 1993; King ve McLelland, 1984; Nickel ve ark., 1977). Sirinks temel olarak trakeanın tabanında iki veya daha fazla trakeal kıkırdak elemanının kaynaşmasıyla oluşan timpanium, hava yolunu dikey olarak ayıran ve onu her bir birincil bronşa yönlendiren pesulus ve bronş kıkırdaklarından oluşur. Titreşim yoluyla fonasyon oluşumunda önemli bir rol oynayan lateral ve medial timpaniform membranlar, kıkırdakları birbirine bağlayarak da sirinksin anatomisine katkı sunarlar (Baumel, 1993; King ve McLelland, 1984; Nickel ve ark., 1977; Warner, 1972). Birçok kuş türünde, cinsel dimorfizmin sirinksin morfolojisi üzerindeki etkileri ile sirinksin anatomik ve histolojik özelliklerini ortaya koyan çalışmalar yapılmış olmasına karşın (Baumel, 1993; Khaksar ve ark., 2012; Nickel ve ark., 1977; Prince ve ark., 2011; Riede ve Goller, 2010a; Riede ve Goller, 2010b; Yılmaz ve ark., 2012), ilginçtir ki sirinkste çeşitli moleküler faktörlerin lokalizasyonunu ve ekspresyonunu gösteren çalışmalar sınırlı kalmıştır (Erdogan ve ark., 2015).

Tüm türlerin dokularının hücre iskeletini; mikrofilamentler, mikrotübüller ve intermediyer filamentler olmak üzere üç tip filament oluşturur. İntermediyer filamentler, hem dokunun işlevine hem de epitel hücrelerinin tipine bağlı olarak lokalize oldukları dokunun ya da hücrenin büyüme ve farklılaşmasını düzenler (Arkaş Aklay ve ark., 2022). İntermediyer filamentler (IF'ler), çoğu omurgalıda hücre iskeletinin ana bileşenleridir. Bu proteinler, insan da dahil olmak üzere tüm omurgalı canlılarda 65 farklı gen ailesi tarafından kodlanır (Hesse ve ark., 2001). IF'ler, doku ve farklılaşma özelliklerine göre dört farklı sitoplazmik sınıfa ayrılır (Fuchs ve Weber, 1994). Tip III IF proteinleri desmin, vimentin, glial fibril asidik protein (GFAP) ve periferini içerir. Memeli hayvanların farklı doku ve organlarında IF proteinleri hakkında çok sayıda çalışma ve bunların hücre iskeleti içindeki işlevleri ve belirli hastalıklardaki rolleri hakkında bilgiler mevcuttur (Hermann ve ark., 1992; Herrmann ve Harris, 1998; Loh ve ark., 2000; Prasad ve ark., 1998). Ancak kanatlı hayvanların doku veya organlarında bu faktörlerin hücresel lokalizasyonu ve olası rollerine ilişkin çalışmalar oldukça sınırlıdır (Madekurozwa, 2013).

Vimentin ve desmin; yapısal destek, hücre göçü, hücresel farklılaşma ve kasılma gibi aktivitelerde görev alan hücre iskeleti proteinlerindedir (Amsterdam ve Aharoni, 1994; Fletcher ve Mullins, 2010; Galou ve ark., 1997; Goldman ve ark., 1996). Vimentin, tip III IF protein ailesinin en yaygın şekilde eksprese edilen, 57 kDa'lık bir proteindir. Vimentin'in, mezenkimal kökenli hücrelerin yanı sıra bazı epitel hücrelerinde de lokalize olduğu bildirilmiştir. Ayrıca vimentin'in, pankreasın öncü hücreleri, sertoli, sinir, trofoblast dev, fibroblastlar, endotel, renal tübüler ve stromal hücreleri ile makrofajlar, nötrofiller ve lökositlerden de eksprese olduğu gösterilmiştir (Carter ve ark., 2005; Cochard ve Paulin, 1984; de Souza ve Katz, 2001; Franke ve ark., 1982; Ko ve ark., 2004; Larsson ve ark., 2004; Mahrle ve ark., 1983). Desmin ise kas hücreleri tarafından eksprese edilir ve tek bir gen tarafından kodlanır (Kohnen ve ark., 2000; Korgun ve ark., 2007; Lazarides, 1980). Sarkolem ve nükleer membrana bağlı miyofibriller etrafında birbirine bağlanan iskeleler oluşturarak kas liflerinin maturasyonunda, korunmasında ve iyileşmesinde de hayati rol oynar (Goldfarb ve ark., 2004). Ekstraselüler matriks proteinlerinden biri olan laminin ise, luminal ve glandüler epitel hücrelerinin oturduğu bazal membranın bir bileşenidir (Tanaka ve ark., 2009). Hücre adezyonu ve farklılaşması, hücre şekli ve hareketi, doku fenotiplerinin korunması ve dokularda canlılığın (survival) devam ettirilmesi gibi birtakım aktivitelerle katkı sağlamaktadır (Colognato ve Yurchenco, 2000; Miner, 2008). Ayrıca, laminin'in kas gelişiminde; miyoblastların adezyonunu, göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik etmede de önemli roller oynadığına inanılmaktadır (Foster ve ark., 1987; Goodman ve ark., 1989; Mayne ve Sanderson, 1985; Ocalan ve ark., 1988; von der Mark ve Ocalan, 1989).

Yapılan kapsamlı literatür taramalarında, kanatlılarda çalışmaların daha çok sirinksin anatomik ve histolojik yapısı ile sirinks mukozasındaki hücrelerin ya da bezlerin salgılarının histokimyasal ve immünohistokimyasal özelliklerini tanımlamaya odaklandığı görülmüştür (Amsterdam ve Aharoni, 1994; Baumel, 1993; Erdogan ve ark., 2015; Hermann ve ark., 1992; Khaksar ve ark., 2012; King and McLelland, 1984; Kingsley ve ark., 2018; Loh ve ark., 2000; Madekurozwa, 2013; Nickel ve ark., 1977; Riede ve Goller, 2010a; Warner, 1972). Hücre iskeletinin ve bazal membranın yapısına katılarak destek sağlayan ve hücre göçü, farklılaşması, maturasyonu, canlılığı ve kasılmasında görev alan vimentin, desmin ve laminin'in, kanatlı sirinksindeki hücresel lokalizasyonu ve ekspresyonlarına ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durum, erişkin kekliklerin sirinksinde bu moleküler faktörlerin fizyolojik fonksiyonlarını ortaya koymayı güçleştirmektedir. Bundan dolayı, bu çalışma kekliklerde sirinks mukozasını oluşturan dokularda hücre iskeleti ve bazal membranın yapısına katılan vimentin, desmin ve laminin'in immünohistokimyasal lokalizasyonunu ve ekspresyonunu ortaya koymak için planlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Dokuların Alınması:** Bu çalışmada özel bir çiftlikte kesimi yapılarak karkasları tüketime sunulan beş erkek (480-540 g) ve beş dişi (360-420 g) olmak üzere toplam on adet sağlıklı yetişkin (2 yaşında) keklük kullanıldı. Kesim sonrasında trekea ile birlikte sirinks diseke edilerek dışarı alındı ve total olarak trekeadan ayrılarak %10'luk formol alkol solüsyonunda 18 saat süre ile tespit edildi. Ardından dokular rutin histolojik işlemleri takiben parafine bloklandı. İmmünohistokimyasal (IHC) analiz için, her hayvanın sirinksinden mikrotom ile 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitler 3-aminopropil-etoksilsilan (APES) (Sigma-Aldrich Chemicals, St) ile kaplanmış lamlara en az iki örnek olacak şekilde yerleştirildi ve oda ısısında kurutuldu. Vimentin, desmin ve laminin proteinlerinin keklük sirinksindeki lokalizasyonu ve ekspresyonunun araştırılması için siringeal doku bloklarının her birinden 3 preparat hazırlandı.

Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmeliğin (15.02.2014) 8. maddesinin (k) bendi 1. fıkrasında belirtildiği üzere çalışmamızda kullandığımız materyal; özel bir çiftliğin kesimhanesinde kesimi yapılan ve karkaslarının insan tüketimine sunulduğu materyal olmasından dolayı HADYEK iznine tabi değildir.

**İmmünohistokimyasal Prosedür:** İmmünohistokimyasal boyama, streptavidin-biyotin-peroksidaz kompleks yöntemi kullanılarak yapıldı. Adezivli lamlara alınan seri kesitler, deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra distile suda çalkalandı. Daha sonra kesitler endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için distile suda hazırlanmış %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 20 dakika muamele edildi. Bunu takiben kesitler yıkamaya alındı. Her bir uygulama sonrasında yıkama işlemleri 0.01 M fosfat tamponlu tuz çözeltisinde (Phosphate buffer saline (PBS)) 3x5 dk. olacak şekilde uygulandı. Yıkamayı takiben, örnekler antijen retrieval işlemi için hazırlanan sitrat tamponunda (0.01 M, pH 6) 95 °C'de 15 dakika süresince kaynatıldıktan sonra soğumaya alındı. Ardından yıkama işlemi yapıldı ve kesitler, dokularda spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için protein blocking çözeltisinde (Ultra V Blok, Thermo Fisher Scientific, Lab Vision Corporation) oda ısısında 15 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kesitler, 1/100 oranında sulandırılmış vimentin (Anti-vimentin rabbit polyclonal antibody, Abcam, ab45939), desmin (Anti-desmin mouse monoclonal antibody, Abcam, ab2530) ve laminin (Anti-laminin rabbit polyclonal antibody, abcam, ab11575) primer antikorları ile +4 °C'de 1 gece süresince inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kesitler 3x5 dk. 0.01M PBS ile yıkandı. Sonrasında kesitler sırası ile 20 dk. biotinlenmiş sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, catalog:TP-125-BN, Thermo Scientific) inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kesitler 3x5 dk. 0.01M PBS ile yıkandıktan sonra, streptavidin-peroksidase (Thermo Fisher Scientific, catalog: TA-125-HR) ile inkübe edildi. Kesitler 3x5 dk. 0.01M PBS ile yıkandıktan sonra, Antijen-antikor reaksiyonlarını göstermek için kesitler diaminobenzidine (DAB Substrate, Thermo Scientific, katalog no: TA-125-HD) kromojen solüsyonunda 5-10 dk. bekletildi ve daha sonra kesitler distile su ile yıkamaya alındı. Ardından Mayer's hematoksilende 2-3 dk. süreyle zit

boyamaya tabi tutulan kesitler akarsu altında yıkandı. Bu yıkama işleminin ardından kesitler alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek entellan (Merck,Darmstadt, Germany, Cat. No:107960) ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal boyamanın özgüllüğü, negatif ve pozitif kontrol kullanılarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak kullanılan sıçan meme bezi primer antikorlarla inkübe edildi. Negatif kontroller de primer antikorlar yerine, dokular PBS veya normal tavşan IgG'si (Santa Cruz Biotechnology, sc-2027) veya normal fare IgG'si (Santa Cruz Biotechnology, sc-2025) ile inkübe edildi. Normal tavşan ve fare IgG'si, tavşan ve farelerden elde edilen konjuge olmayan, afinitesi saflaştırılmış bir izotip kontrol immünooglobulindir. Tüm örnekler aynı protokolle değerlendirildi.

Boyamalar sonrası preparatlar Nikon-Eclipse 400 DSRI Nikon dijital fotoğraf makinesi (NIS Elements Imaging Software (version 3.10)) ataçmanlı araştırma mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

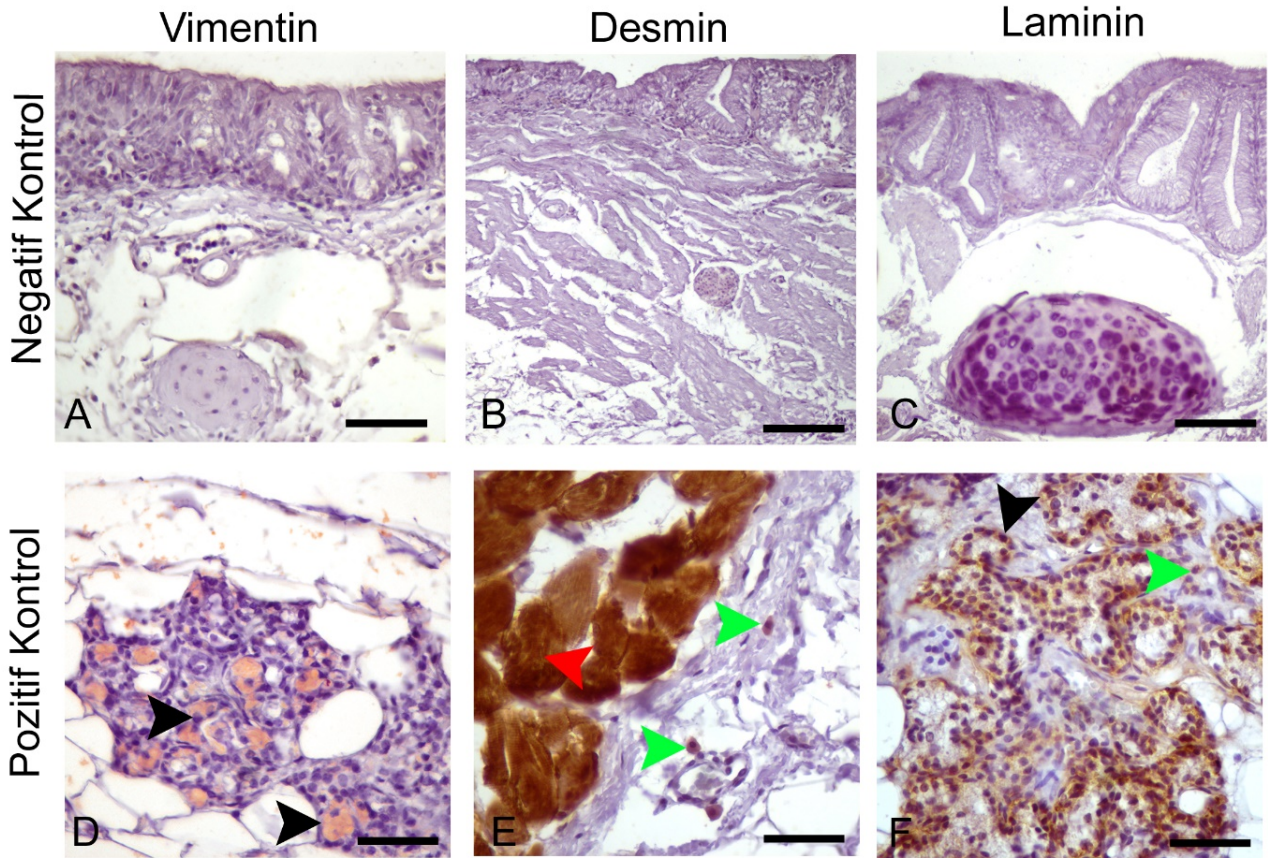
**Yarı Kantitatif Değerlendirme:** İmmünohistokimyasal boyamanın değerlendirilmesi, yoğunluk skoru (intensity score) ile semikantitatif olarak yapıldı. Boyanan hücrelerin boyanma şiddeti; (-) boyanma yok, (+) zayıf, (++) orta derecede, (+++) kuvvetli boyanma şeklinde belirlendi (Akbalık ve ark., 2015). Hücrelerdeki immün boyanma yoğunluğu iki bağımsız araştırmacı tarafından yapıldı ve iki araştırmacının ortalama puanı hesaplandı. Vimentin, desmin ve laminin için pozitif immünreaksiyonlar, 200x ve 400x büyütmede sirinksin bölümleri taranarak yüksek ekspresyon alanlarında yapıldı. Her bir sirinks için rastgele seçilen üç alan değerlendirildi ve bu bireysel sonuçların ortalaması tek bir değer olarak alındı. Kekliklerde sirinksin luminal ve bez epitel, stromal ve düz kas hücreleri ile kıkırdak hücreleri olmak üzere beş farklı hücre grubu değerlendirildi. Kan damarları ise ayrıntılı olarak değerlendirilmemiş olup, sadece genel görünümleri anlatılmıştır.

## Bulgular

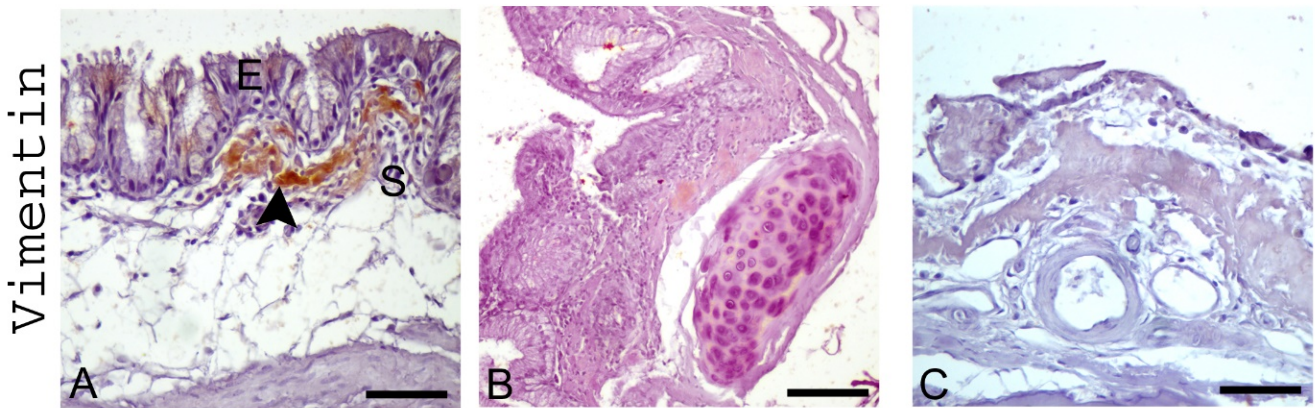
Hem erkek hem de dişi keklüklerde vimentin, desmin ve laminin ekspresyonlarının sirinksin yapısına katılan doku ve hücrelerde benzer olduğu ve önemli farklılıkların bulunmadığı ortaya konuldu. Negatif kontrollerde immünreaksiyon gözlenmezken, pozitif kontrollerde ise sıçan meme bez epitel ve stromal hücrelerinde vimentin, desmin ve laminin pozitif olduğu görüldü (Şekil 1). Ayrıca, keklük sirinksinde vimentin, desmin ve laminin ekspresyonlarına ait sonuçlar Tablo 1 de özetlendi.

**Tablo 1.** Sirinksin farklı histolojik katmanlarında vimentin, desmin ve laminin'in lokalizasyonları için yoğunluk skorları.

Sirinks Hücreleri	Vimentin	Desmin	Laminin
Epitel Hücreleri	-	-	++
Bağ doku hücreleri	-	-	++
Kas hücreleri	++	++	+++
Kıkırdak hücreleri	-	+	+++
Kan damarı	-	-	++



**Şekil 1.** Negatif kontrol için, sirinkste primer antikolar yerine kullanılan fare ve tavşan IgG antikolarında vimentin, desmin ve laminin için immün boyamaya rastlanmamıştır. Pozitif kontrol için, fare meme bezinin alveolar ve duktal epitel hücreleri ile düz kas hücrelerinde vimentin, desmin ve laminin için güçlü lokalizasyonların görünümü. Siyah ok başı: epitel hücresi, kırmızı ok başı: kas dokusu, yeşil ok başı bağ dokusu hücresi. Barlar A: 50µm, B-C: 25µm, D-F: 50µm.



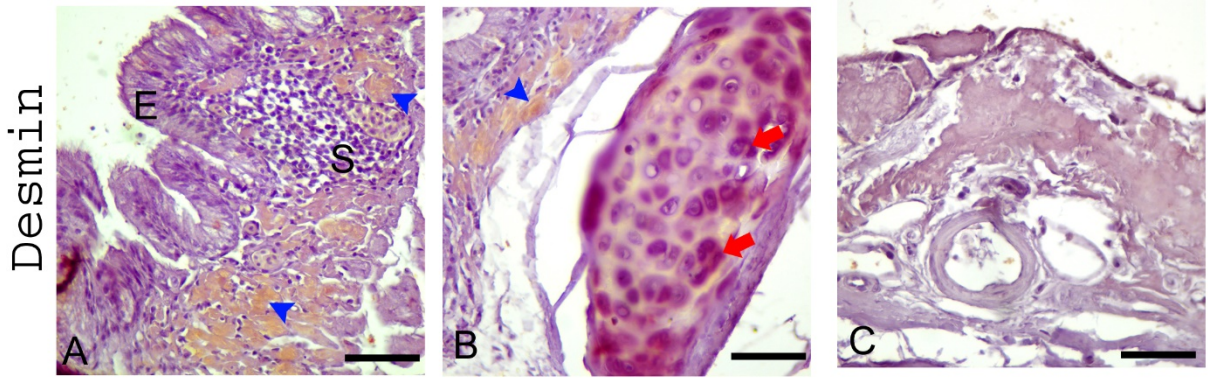
**Şekil 2.** Sirinkste vimentin immünreaktivitesi, immünohistokimyasal boyama, diaminobenzidin kromojen. E: Epitel katmanı, S: bağ doku, Siyah ok başı: düz kas hücreleri. Bar: A 50 µm, B-C: 25µm.

**Vimentin immunolokalizasyonu:** Sirinksin duvar yapısına katılan düz kas hücrelerinde orta yoğunlukta vimentin ekspresyonu görüldü. Buna karşın, trakeal ve bronşial ile pesulusun luminal ve bez epitel hücreleri, stromal hücreler, lateral ve medial timpaniform membranların epitel ve stromal hücrelerinde, kan damarlarında vimentin ekspresyonuna rastlanmadı (Şekil 2).

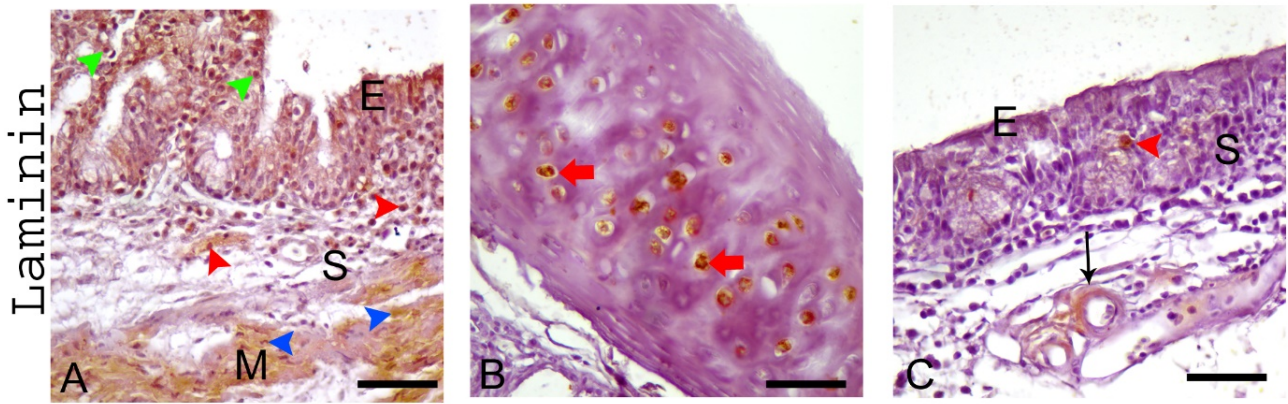
**Desmin immunolokalizasyonu:** Düz kas hücrelerinde orta yoğunlukta, bazı kıkırdak hücrelerinde ise zayıf bir

desmin ekspresyonu görüldü. Luminal ve bez epitel hücreleri ile timpaniform membranların epitel hücrelerinde ve kan damarlarında desmin ekspresyonu gözlenmedi (Şekil 3).

**Laminin immunolokalizasyonu:** Sirinksin düz kas ve kıkırdak hücrelerinde laminin ekspresyonunun güçlü, trakeal ve bronşial ile pesulusun luminal ve bez epitel hücreleri, bazı stromal hücreler, lateral ve medial timpaniform membranların epitel ve bazı stromal hücrelerinde, kan damarlarında laminin ekspresyonlarının orta yoğunlukta olduğu belirlendi (Şekil 4).



**Şekil 3.** Sirinkste desmin immunreaktivitesi, immünohistokimyasal boyama, diaminobenzidin kromojen. E: Epitel katmanı, S: bağ doku, Mavi ok başı: düz kas hücreleri, kırmızı oklar: Kıkırdak hücreleri. Bar: A- B: 50µm, C: 25 µm.



**Şekil 4.** Sirinkste laminin immunreaktivitesi, immünohistokimyasal boyama, diaminobenzidin kromojen. E: Epitel katmanı, S: bağ doku, M: Kas doku, yeşil ok başı: epitel hücreleri, kırmızı ok başı: bağ dokusu hücreleri, kırmızı oklar: Kıkırdak hücreleri, siyah ok: Kan damarı. Bar: A-C: 50 µm.

## Tartışma ve Sonuç

Tüm ökaryotik canlılarda hücre iskeleti, intermedier filamentler (IF) ile ekstraselüler matris proteinlerini içerir ve bu bileşenler ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında lifli bir ağ oluştururlar (Kohnen ve ark., 2000). Bu moleküler faktörlerin, artık hayvanlarda birçok doku ve organdaki hücre grubunda bulunduğu kabul edilmektedir. Bu çalışma, erişkin keklik sirinksinde intermedier filamentlerden vimentin ve desmin ile bağdoku komponentlerinden laminin'in ekspresyonlarını ortaya koyan ilk çalışmadır. Bizim bulgularımız, keklik sirinksinde vimentin ve desmin'in sadece düz kas ve kıkırdak hücrelerinden, laminin ise luminal ve bez epitel, stromal ve düz kas hücreleri ile damar endotel ve düz kas hücrelerinden ekspresyon gösterdiği gösterdi. Memelilerde olduğu gibi kekliklerin sirinksinde de vimentin, desmin ve laminin'in bazı hücre gruplarından ekspresyon olması, keklik sirinksinde bu faktörlerin hücre iskeletine ve doku bütünlüğüne katkı sunduğunu göstermiştir.

Araştırmacılar, insan ve bazı memeli türlerinde solunum sisteminin de dahil olduğu farklı organlarda vimentin, desmin ve laminin proteinlerinin hücresel ekspresyonu ve dağılımından bahsetmişlerdir (Carter ve ark., 2005; Fletcher ve Mullins, 2010; Franke ve ark., 1982; Fuchs ve Weber,

1994; Galou ve ark., 1997; Goldman ve ark., 1996; Herrmann ve ark., 1992; King ve McLelland, 1984; Larsson ve ark., 2004; Loh ve ark., 2000; Madekurozwa, 2013; Mahrle ve ark., 1983; Prasad ve ark., 1998). Kanatlılarda sirinkste dahil olmak üzere solunum sistemi organlarında bu faktörlerin ekspresyonlarına ilişkin bilgi bulunmamaktadır. Bundan dolayı da memelilerin farklı doku ve organlarında yapılan bu faktörler ile ilgili çalışmalar dikkate alınarak tartışma şekillendirilmiştir.

Hamsterlerin aort ve midesinde yapılan bir çalışmada, vimentin'in sadece aort düz kas hücrelerinden ekspresyon olduğu, desmin'in ise ekspresyon göstermediği bildirilmiştir. Hamster midesinde düz kas hücrelerinde desmin'in belirgin immünreaksiyonlar gösterdiği, vimentin'in ise lamina propria ve submukozada lokalize olan bazı fibrosit/fibroblastlarda lokalize olduğu ortaya konulmuştur (Frank ve Warren, 1981). Köpeklerde Rete testis epitelinin hem de desmin'i ekspresyon ettiği ortaya konulmuştur (Wakui ve ark., 1994). Sıçanlarda böbrek glomeruluslarında desmin'in ekspresyon olduğu ve yaşın ilerlemesine bağlı olarak da ekspresyon yoğunluğunun arttığı saptanmıştır. Yine aynı çalışmada, vimentin ekspresyonunun glomeruluslarda zayıf olduğu gösterilmiştir (Yaoita ve ark., 1990). Embriyonal gelişim süresince desmin ekspresyonunun

farelerde, erken dönemde Mekkel kıkırdağının mandibular kemik ve mandibular kemiğe bağlı miyohiyoid kasında zayıf olduğu, gelişimin ilerlemesine bağlı olarak bu ekspresyonun mekkel kıkırdağının miyohiyoid kıkırdağa bağlandığı bölümden itibaren güçlendiği bildirilmiştir. Vimentin'in ise tüm gelişim süresince kas ve kemik gibi çevre dokularda yaygın bir ekspresyon sergilediği ifade edilmiştir (Kishi ve ark., 2012). Henzen-Logmans ve ark. (1987) ise insan tiroid bezinde vimentin ekspresyonunun varlığından bahsetmişlerdir. Sunulan çalışmada, kekliklerin sirinkste vimentin'in ve desmin'in özellikle düz kas hücreleri ve bazı kıkırdak hücrelerinden zayıf ya da orta yoğunlukta eksprese olduğu, trakeal ve bronşial ile pesulusun luminal ve bez epitel hücreleri, stromal hücreler, lateral ve medial timpaniform membranların epitel ve stromal hücreleri ile kan damarlarından eksprese olmadıkları ortaya konulmuştur.

Arter düz kas hücre kültürlerinde laminin'in güçlü immünreaksiyonlar gösterdiğini bildiren çalışmalar vardır (Hedin ve ark., 1988). Sıçan embriyolarına ait mandibular ve sublingual bezlerde laminin'in güçlü ekspresyonları ortaya konulmuştur (Kadoya ve ark., 1997). Fare embriyolarında; tükürük bezi, böbrek ve akciğer epitel hücrelerinin laminin'i değişen yoğunluklarda eksprese ettiğini bildiren çalışmalar yapılmıştır (Durbeej ve ark., 1995; 2001). Yine insanların submandibular bez epitel hücrelerinin güçlü laminin ekspresyonları gösterdiği ifade edilmiştir (Hoffman ve ark., 1996). İnsan ve sığır fütüslerinin epifizial kıkırdaklarından elde edilen hücre kültürlerinde kondrositlerin güçlü laminin ekspresyonları gösterdiği bildirilmiştir (Dürr ve ark., 1996). Köpekte yapılan bir çalışmada, kalbin atrioventriküler kapakçıklarında lokalize olan hiyalin kıkırdağın periselüler matriksindeki hücrelerin yoğun laminin ekspresyonu gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Aupperle ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda da yukarıda bahsedilen çalışmalardakine benzer şekilde keklik sirinksinin yapısına katılan düz kas ve kıkırdak hücrelerinde laminin ekspresyonunun güçlü olduğu, trakeal ve bronşial ile pesulusun luminal ve bez epitel hücreleri, bazı stromal hücreler, lateral ve medial timpaniform membranların epitel ve bazı stromal hücreleri ile kan damarlarının orta yoğunlukta laminin ekspresyonu gösterdiği ortaya konulmuştur.

Bitkiler ve mantarlardan farklı olarak, hayvan hücrelerinde hücre duvarı bulunmaz ve bu türlerin hücre ve dokularını stabilize etmek için birtakım yollar gerekir. Ayrıca, hayvanlarda nefes alma, fonasyon, kan dolaşımı, beslenme ve sindirim sırasındaki peristaltik faaliyetler ve hareket gibi çeşitli temel faaliyetler için kaslara ihtiyaç duyulur. Bu otonom hareketler hücre ve dokuların bütünlüğü üzerinde ciddi bir stres oluşturur. Bu mekanik stresle başa çıkmak için organizmada birtakım moleküler mekanizmalar geliştirmiştir. Eklem bacaklılar vücut bölümlerinin stabilizasyonu için dış iskeletlerini kullanırken, diğer hayvanlar hücre ve dokularını stabilize etmek için çeşitli moleküler bileşenleri kullanırlar. Hayvanların ayırt edici özelliklerinden biri desmozomlar, zonula okludens, zonula adherens ve gap junctionlar gibi hücre-hücre bağlantılarının varlığıdır. Hücre iskelet sistemlerinin bileşenlerinden olan intermedier filamentler, bu hücresel bağlantılar ile birlikte her bir hücrede hem dinamik hem de işlevsel olarak dokulara

entegre olan yüksek sertlikte ve esneklikte transselüler ağlar oluştururlar. Böylelikle, intermedier filament sistemlerinin oluşturmuş olduğu iskelet, hücrelerin, dokuların ve nihayetinde tüm organların ortak fizyolojik gereksinimlerini karşılamada anahtar bir rol üstlenir (Herrmann ve ark., 2007). Sunulan çalışmada, erişkin keklik sirinksinde, intermedier filamentlerden vimentin ve desmin ile bağdoku komponentlerinden laminin'in eksprese olması, ses üretim organı olan sirinksin hücre ve dokularında bu moleküler faktörlerin birbirleriyle etkileşime girerek yukarıda bahsedildiği gibi organ bütünlüğünün korunmasında önemli roller oynayabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak, keklik sirinksinin farklı doku katmanlarında memelilerdeki gibi vimentin, desmin ve laminin'in eksprese olduğu gösterildi. Vimentin ve desmin'in sadece düz kas ve bazı kıkırdak hücrelerinden, laminin'in ise epitel, düz kas ve stromal hücrelerinin de dahil olduğu farklı hücre grupları ile kan damarlarından değişen yoğunluklarda eksprese olduğu görüldü. Bu moleküler faktörlerin, keklik sirinksindeki hücre gruplarının iskelet yapısına katılarak hücrelerdeki homeostazın sağlanmasında ve organın fonksiyon gördüğü fizyolojik süreçlerin devamlılığında etkileri olduğunu önerebiliriz. Yine de, vimentin, desmin ve laminin'in; sirinksin epitelyal, stromal ve düz kas hücrelerindeki ekspresyonunu ve fonksiyonlarını düzenleyen mekanizmaları tam olarak anlamak için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar gerçek, potansiyel ya da algılanan herhangi bir çıkar çatışması yaşamadıklarını belirtmişlerdir.

## Finansal Destek

Bu araştırma kamu, ticari veya kâr amacı gütmeyen sektörlerdeki herhangi bir fon kuruluşundan özel bir destek almamıştır.

## Etik Onay

Hayvan Deneyleri Etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmeliğin (15.02.2014) 8. maddesinin (k) bendi 1. fıkrasında belirtildiği üzere çalışmamızda kullandığımız materyal; özel bir çiftliğin kesimhanesinde kesimi yapılan ve karkaslarının insan tüketimine sunulduğu materyal olmasından dolayı HADYEK iznine tabi değildir.

## Finansal destek

Bu çalışma, Şırnak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2021.FNAP.14.04.01 proje numarası ile desteklenmiştir.

## Benzerlik Oranı

Makalenin benzerlik oranının sisteme yüklenen raporda belirtildiği gibi %13 olduğunu beyan ederiz.

## Teşekkür

Bu çalışmada desteklerini veren Şırnak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimizi sunarız.

## Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: BB, UT  
Tasarım: BB, NA  
Denetleme/Danışmanlık: UT, NA  
Veri Toplama ve/veya İşleme: BB, NA, FÇ  
Analiz ve/veya Yorum: BB, UT  
Kaynak Taraması: FÇ, BB  
Makalenin Yazımı: BB  
Eleştirel İnceleme: UT, NA, FÇ

## Kaynaklar

- Akbalik ME, Sagsoz H, Erdogan S, 2015: Osteopontin Epression in the Intestine of Chukar Partridge (*Alectoris chukar*, Gray, 1830). *Anim Biol*, 65 (3-4), 287-298.
- Amsterdam A, Aharoni D, 1994: Plasticity of cell organization during differentiation of normal and oncogene transformed granulosa cells. *Microsc Res Tech*, 27 (2), 108-124.
- Arkaş Alklay A, Topaloğlu U, Celenk F, Aydın N, Bayram B, Atalar Ö, 2022: Expression of Cytokeratin 8, 18 and 19 in the Period of Late Lactation and Involution in Cow Mammary Gland. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 28 (3), 299-306.
- Aupperle H, März I, Schoon HA, 2008: Detection and characterization of chondroid metaplasia in canine atrioventricular valves. *J Comp Pathol*, 139 (2-3), 113-120.
- Baumel JJ, 1993: Handbook of avian anatomy: nomina anatomica avium. Publications of the Nuttall Ornithological Club (USA), no. 23.
- Carter V, Shenton BK, Jaques B, Turner D, Talbot D, Gupta A, Chapman CE, Matthews CJ, Cavanagh G, 2005: Vimentin antibodies: a non-HLA antibody as a potential risk factor in renal transplantation. *Transplant Proc*, 37, 654-657.
- Cochard P, Paulin D, 1984: Initial expression of neurofilaments and vimentin in the in vivo. *J. Neurosci Res*, 4, 2080-2094.
- Colognato H, Yurchenco PD, 2000: Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*, 218 (2), 213-234.
- De Souza PC, Katz SG, 2001: Coexpression of cytokeratin and vimentin in mice trophoblastic giant cells. *Cell Tissue Res*, 33, 40-45.
- Durbbej M, Larsson E, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Roberds SL, Campbell KP, Ekblom P, 1995: Non-muscle alpha-dystroglycan is involved in epithelial development. *J Cell Biol*, 130 (1), 79-91.
- Durbbej M, Talts JF, Henry MD, Yurchenco PD, Campbell KP, Ekblom P, 2001: Dystroglycan binding to laminin  $\alpha$ 1LG4 module influences epithelial morphogenesis of salivary gland and lung in vitro. *Differ*, 69 (2-3), 121-134.
- Dürr J, Lammi P, Goodman SL, Aigner T, von der Mark K, 1996: Identification and immunolocalization of laminin in cartilage. *Exp Cell Res*, 222 (1), 225-233.
- Erdogan S, Sagsoz H, Paulsen F, 2015: Functional Anatomy of the Syrinx of the Chukar Partridge (Galliformes: *Alectoris chukar*) as a Model for Phonation Research. *Anat Rec*, 298, 602-617.
- Fletcher DA, Mullins RD, 2010: Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463 (7280), 485-492.
- Foster RF, Thompson JM, Kaufman SJ, 1987: A laminin substrate promotes myogenesis on rat skeletal muscle cultures: Analysis of replication and development using anti desmin and anti BrdUrd monoclonal antibodies. *Dev Biol*, 122, 11-20.
- Frank ED, Warren L, 1981: Aortic smooth muscle cells contain vimentin instead of desmin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78 (5), 3020-3024.
- Franke WW, Grund C, Kuhn C, Jackson BW, Illmensee K, 1982: Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differ*, 23, 43-59.
- Fuchs E, Weber K, 1994: Intermediate filaments: Structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 63, 345-382.
- Galou M, Gao J, Humbert J, Mericskay M, Li Z, Paulin D, Vicart P, 1997: The importance of intermediate filaments in the adaptation of tissues to mechanical stress: evidence from gene knockout studies. *Biol Cell*, 89 (2), 85-97.
- Goldfarb LG, Vicart P, Goebel HH, Dalakas MC, 2004: Desmin myopathy. *Brain*, 127 (4), 723-734.
- Goldman RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM, 1996: The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol*, 134 (4), 971-983.
- Goodman SL, Deutzmann R, Nurcombe V, 1989: Locomotory competence and laminin-specific cell surface binding sites are lost during myoblast differentiation. *Development*. 106, 795-802.
- Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J, 1988: Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol*, 107 (1), 307-319.
- Henzen-Logmans SC, Mullink H, Ramaekers F, Tadema T, Meijer CJ, 1987: Expression of cytokeratins and vimentin in epithelial cells of normal and pathologic thyroid tissue. *Virchows Arch*, 410 (4), 347-354.
- Herrmann H, Hofmann I, Franke WW, 1992: Identification of a nonapeptide motif in the vimentin head domain involved in intermediate filament assembly. *J Mol Biol*, 223, 637-650.
- Herrmann H, Harris JR, 1998: Intermediate Filaments. *Subcell Biochem*, 31, 1-622.
- Herrmann H, Bär H, Kreplak L, Strelkov SV, Aebi U, 2007: Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (7), 562-573.
- Hesse M, Magin TM, Weber K, 2001: Genes for intermediate filament proteins. *J Cell Sci*, 114, 2569-2575.
- Hoffman MP, Kibbey MC, Letterio JJ, Kleinman HK, 1996: Role of laminin-1 and TGF-beta 3 in acinar differentiation of a human submandibular gland cell line (HSG). *J Cell Biol*, 109 (8), 2013-2021.
- Kadoya Y, Salmivirta K, Talts JF, Kadoya K, Mayer U, Timpl R, Ekblom P, 1997: Importance of nidogen binding to laminin gamma1 for branching epithelial morphogenesis of the submandibular gland. *Development*, 124 (3), 683-691.
- Khaksar Z, Kookhdan ET, Parto P, 2012: A study on anatomy and histological structure of larynx in adult male and female turkeys. *Int J Zool*, 7 (3), 245-250.
- King AS, McLelland J, 1984: Coelomic cavities. Birds: Their Structure and Function. 2nd ed. East Sussex, England: Bailliere Tindall, 79-83.
- Kingsley EP, Eliason CM, Riede T, Li Z, Hiscock TW, Farnsworth M, Thomson SL, Goller F, Tabin CJ, Clarke JA, 2018: Identity and novelty in the avian syrinx. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115(41), 10209-10217.
- Kishi A, Yamamoto M, Kikuchi A, Iwanuma O, Watanabe Y, Ide Y, Abe S, 2012: Gene and protein expressions of vimentin and

- desmin during embryonic development of the mylohyoid muscle. *Anat Sci Int*, 87 (3), 126-131.
- Ko SH, Suh SH, Kim BJ, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Son HS et. all, 2004: Expression of the intermediate filament vimentin in proliferating duct cells as a marker of pancreatic precursor cells *Pancreas*, 28, 121-128.
- Kohnen G, Campbell S, Jeffers MD, Cameron IT, 2000: Spatially regulated differentiation of endometrial vascular smooth muscle cells. *Hum Reprod*, 15 (2), 284-292.
- Korgun ET, Cayli S, Asar M, Demir R, 2007: Distribution of laminin, vimentin, and desmin in the rat uterus during initial stages of implantation. *J Mol Histol*, 38 (4), 253-260.
- Larsson A, Wilhelmsson U, Pekna M, Pekny M, 2004: Increased cell proliferation and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of old GFAP(-/-)Vim(-/-) mice. *Neurochem Res*, 29, 2069-2073.
- Lazarides E, 1980: Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*, 283 (5744), 249-255.
- Loh SH, Chan WT, Gong Z, Lim TM, Chua KL, 2000: Characterization of a zebrafish (*Danio rerio*) desmin cDNA: an early molecular marker of myogenesis. *Differ*, 65, 247-254.
- Madekurozwa MC, 2013: An Immunohistochemical Study of the Oviduct in the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*), *Anat Histol Embryol*, 42, 48-56.
- Mahrle G, Bolling R, Osborn M, Weber K, 1983: Intermediate filaments of the vimentin and prekeratin type in human epidermis. *J Invest Dermatol*, 81, 46-48.
- Mayne R, Sanderson RD, 1985: The extracellular matrix of skeletal muscle. *Collagen Rel Res*, 5, 449-468.
- Miner JH, 2008: Laminins and their roles in mammals. *Microsc Res Tech*, 71 (5), 349-356.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E, 1977: Anatomy of the domestic birds. Verlag Paul Parey. Berlin, German.
- Ocalan M, Goodman SL, Kuhl U, Haushka SD, von der Mark K, 1988: Laminin alters cell shape and stimulates motility and proliferation of murine skeletal myoblasts. *Dev Biol*, 125, 158-167.
- Prasad SC, Thraves PJ, Kuettel MR, Srinivasarao GY, Dritschilo A, Soldatenkov VA, 1998: Apoptosis-associated proteolysis of vimentin in human prostate epithelial tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 249, 332-338.
- Prince B, Riede T, Goller F, 2011: Sexual dimorphism and bilateral asymmetry of syrinx and vocal tract in the European starling (*Sturnus vulgaris*). *J Morphol*, 272 (12), 1527-1536.
- Riede T, Goller F, 2010a: Functional morphology of the sound-generating labia in the syrinx of two songbird species. *J Anat*, 216(1), 23-36.
- Riede T, Goller F, 2010b. Peripheral mechanisms for vocal production in birds—differences and similarities to human speech and singing. *Brain Lang*, 115(1), 69-80.
- Riede T, Thomson SL, Titze IR, Goller F, 2019: The evolution of the syrinx: An acoustic theory. *PLoS Biol*, 17(2), 1-22.
- Tanaka T, Wang C, Umesaki N, 2009: Remodeling of the human endometrial epithelium is regulated by laminin and type IV collagen. *Int J Mol Med*, 23(2), 173-180.
- von der Mark K, Ocalan M, 1989: The dedifferentiation and redifferentiation of myoblasts is triggered by fibronectin and laminin. *Differ*, 40, 150-157.
- Wakui S, Furusato M, Ushigome S, Kano Y, 1994: Coexpression of different cytokeratins, vimentin and desmin in the rete testis and epididymis in the dog. *J Anat*, 184 (1), 147-151.
- Warner RW, 1972: The anatomy of the syrinx in passerine birds. *J Zool*, 168 (3), 381-393.
- Yaoita E, Kawasaki K, Yamamoto T, Kihara I, 1990: Variable expression of desmin in rat glomerular epithelial cells. *Am. J Clin Pathol*, 136(4), 899-908.
- Yilmaz B, Yilmaz R, Arican I, Yildiz H, 2012: Anatomical structure of the syrinx in the mallard (*Anas platyrhynchos*). *Harran Univ Vet Fak Derg*, 1 (2), 111-116.





## Assessment on the "Tail Pull Injuries": Case Series of 8 Cats

Emine ÇATALKAYA<sup>1,a,\*</sup>, Sadık YAYLA<sup>1,b</sup>, Semih ALTAN<sup>1,c</sup>, Berna ERSÖZ KANAY<sup>1,d</sup>, Nahit SAYLAK<sup>1,e</sup>, Şimal HATİPOĞLU<sup>1,f</sup>

<sup>1</sup>University of Dicle, Faculty of Veterinary Medicine,  
Department of Surgery, Diyarbakır, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0001-7884-5407

<sup>b</sup>ORCID: 0000-0001-6734-421X

<sup>c</sup>ORCID: 0000-0003-3158-3678

<sup>d</sup>ORCID: 0000-0001-5165-0618

<sup>e</sup>ORCID: 0000-0003-2008-5403

<sup>f</sup>ORCID: 0000-0003-2230-2731

Received: 30.03.2023

Accepted: 17.05.2023

**How to cite this article:** Çatalkaya E, Yayla S, Altan S, Ersöz Kanay B, Saylak N, Hatipoğlu Ş. (2023). Assessment on the "Tail Pull Injuries": Case Series of 8 Cats. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 75-79, DOI:10.31196/huvfd.1273597.

**\*Correspondence:** Emine ÇATALKAYA

Dicle University, Faculty of Veterinary Medicine

Department of Surgery, Diyarbakir, Turkey.

e-mail: [eminecatalkaya21@gmail.com](mailto:eminecatalkaya21@gmail.com)

Available on-line at:

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Abstract:** Tail-pulling injuries in cats often occur with trauma or pinching of the tail. This condition often causes damage to the nerves that supply the tail, bladder, perineum, and anus. An accurate and good neurological examination is necessary to grade the severity of the injury. The aim of this study in a case series of 8 cats with "Tail Pulling Injuries" was to discuss the clinical results and to provide practical information. Medical records of cats with tail-pulling injuries, loss of voluntary movement of the tail, and loss of pain perception were reviewed retrospectively. Among the cats with tail pull injuries, those with open tail fractures, tail wounds requiring amputation, and spinal trauma were excluded from the study. According to neurological examination findings and tail condition, medical treatment and tail amputation were performed if necessary. Seven of the eight cats in the study had fully recovered by the end of the second week. As a result, in the case of tail pull injuries in cats, if there is no fracture or luxation-related gap, amputation should not be considered immediately. It can be supported by an effective medical treatment. In addition, amputation will be inevitable if there is a gap due to a fracture or luxation in the tail.

**Keywords:** Cat, Nerve damage, Tail pull injuries, Urinary and fecal continence.

### Kuyruk Çekme Yaralanmaları" Üzerine Değerlendirme: 8 Kedilik Vaka Serisi

**Özet:** Kedilerde kuyruk çekme yaralanmaları genellikle travma veya kuyruğun kısırılması ile ortaya çıkar. Bu durum genellikle kuyruğu, idrar kesesini, perineumu ve anüsü besleyen sinirlerde hasara neden olur. Yaralanmanın ciddiyetini derecelendirmek için doğru ve iyi bir nörolojik muayene gereklidir. "Kuyruk Çekme Yaralanmaları" olan 8 kedi vaka serisindeki bu çalışmada, klinik sonuçların tartışılması ve uygulamaya yönelik bilgiler verilmesi amaçlanmıştır. Kuyruk çekme yaralanması, istemli kuyruk hareketi kaybı ve ağrı algısı kaybı olan kedilerin tıbbi kayıtları retrospektif olarak incelendi. Kuyruk çekme yaralanması olan kedilerden açık kuyruk kırığı, amputasyon gerektiren kuyruk yarası ve omurga travması olanlar çalışma dışı bırakıldı. Nörolojik muayene bulguları ve kuyruğun durumuna göre medikal tedavi ve gerekli görüldüğünde kuyruk amputasyonu yapıldı. Çalışmadaki 8 kediden 7'si ikinci haftanın sonunda tamamen iyileşmişti. Sonuç olarak kedilerde kuyruk çekme yaralanmalarında kırık veya luksasyona bağlı boşluk yoksa hemen amputasyon düşünülmemelidir. Etkili bir medikal tedavi ile desteklenebilir. Ayrıca kuyrukta kırık veya çıkık nedeniyle boşluk oluşursa amputasyon kaçınılmaz olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** İdrar ve fekal kontinans, Kedi, Kuyruk çekme yaralanmaları, Sinir hasarı.

## Introduction

"Tail pull injury" in cats, is a common traumatic situation caused by tail pulling. This situation occurs because of pulling the tail when the cat is trying to escape when it gets stuck somewhere. It usually occurs with trauma affecting the pelvis (Barnes, 2020; Brooks, 2021; Couper and Decker, 2020; Meeson and Corr, 2011; Tatton et al., 2009). The cause of the developing neurological deficit is associated with hemorrhage, edema, and rupture of nerve roots in the terminal spinal cord (Couper and Decker, 2020; Tatton et al., 2009). In addition, coccygeal fractures and/or dislocations and caudal sacral fractures are also considered tail-pulling injuries. Because almost all of them have similar clinical symptoms their treatments are identical. A tail pull injury may also occur as a single lesion following trauma or in association with multiple pelvic fractures/iliosacral luxations, hind limb fractures, spine fractures, lung contusions, or other soft tissue injuries (Brooks, 2021; Davies and Walmsley, 2012; Flegel, 2016; Meeson and Corr, 2011).

Clinical signs in cats that develop tail-pulling injuries may include urinary and fecal incontinence, paraparesis, and tail paralysis (Barnes, 2020; Brooks, 2021; Caraty et al., 2018; Couper and Decker, 2020; Davies and Walmsley, 2012). Caudal nerve lesions cause tail paralysis, while damage to the pelvic or pudendal nerves causes urinary and fecal dysfunction (Couper and Decker, 2020; Davies and Walmsley, 2012; Lanz, 2002; Tatton et al., 2009).

Diagnosis of tail-pulling injuries is usually straight forward, and sacrocaudal luxation, subluxation, or fracture is often easily identified by radiological examination. The prognosis in cats with tail-pulling injuries varies depending on the severity of the nerve damage. While paraparesis is usually temporary, the return of urinary and fecal continence may take longer (Couper and Decker, 2020; Davies and Walmsley, 2012; Meeson and Corr, 2011).

This study aimed to evaluate "Tail Pull Injuries" in a case series of 8 cats.

## Material and Methods

In this study, the medical records of cats with tail-pulling injuries, loss of voluntary movement of the tail, and loss of pain perception between 2019 and 2023 were retrospectively reviewed. This study protocol was approved by the Dicle University Health Sciences Application and Research Center Local Ethics Committee (E-35582840-020-471830). Among the cats with tail pull injuries, those with open tail fractures, tail wounds requiring amputation, and spinal trauma were excluded from the study. However, cats presenting with orthopedic problems in the hind limbs were not excluded.

A detailed neurological examination was performed after a general and systemic examination for each cat included in the study. During the neurological evaluation, the focus was on the somatic caudal and pudendal nerves because the somatic nerve is responsible for the voluntary motor function of the tail and pain perception. The pudendal nerve is responsible for perianal and perineal reflexes.

The behavior of the cat during urination was observed. The position of urinating on the sand with the normal flow was evaluated as normal urination behavior. In addition, if the urinary bladder was empty or not filled on palpation of the caudal abdomen and there was wetness on the sand, this was considered incontinence.

Ventrodorsal and lateral images were taken for tail radiographic evaluation of all cats.

The classification in Table 1 was categorized into five grades as previously defined by the authors (Grierson, 2011; Smeak and Olmstead, 1985).

**Table 1.** Classifications for tail pull injuries in cats (from Smeak and Olmstead, 1985; Grierson, 2011).

Grade	Neurological signs	Nerves	Prognosis for urination
I	Hyperesthesia	-	Excellent
II	Flaccid tail paralysis	Coccygeal	Excellent
III	-Flaccid tail paralysis, -Some residual urine	Coccygeal Pelvic	Good in most cases
IV	-Flaccid tail paralysis, -Some residual urine, -Perineal reflex and anal tone reduced	Coccygeal Pelvic Pudental	75 per cent recovery rate
V	-Flaccid tail paralysis, -Some residual urine, -Perineal reflex and anal tone reduced, -Urethral tone diminished or absent (easy to express bladder)	Coccygeal Pelvic Pudental	50 per cent recovery rate

For cats with tail pulling injuries, either cage rest was recommended or surgically amputated. In cases where the bladder could not be emptied due to decreased detrusor tone and/or increased urethral sphincter tone, bethanechol (cholinergic): (Myocholine®10 mg, Glenwood GmbH, München/Germany) 1.25–7.5 mg/cat (twice a day) was used to increase bladder detrusor muscle tone as medical treatment. Alfuzosin ( $\alpha$ 1 blocker) (Xalfu® XL 10 mg,

Eczacıbası, İstanbul/Türkiye): 2.5 mg/cat (once a day) was used to decrease urethral sphincter tone.

## Results

In this retrospective review, eight cats (five males, three females) were investigated from 2019 to 2023 for tail pull

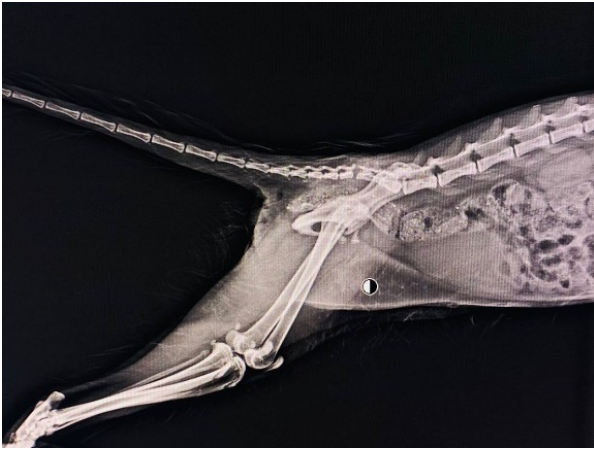
injuries. Their average age was two years (min 7 months, max four years). All eight cats had a history of trauma. These were in the form of a traffic accident (3 cats) and pinching his tail (5 cats).

According to the classification given in Table 1, 4 cases were grade III, 3 cases were grade IV, and 1 case was grade V.

All cats included in the study, one had sacrocaudal luxation, 2 had caudal luxation, 3 had a fracture of the caudal vertebra, and 2 had a fracture of the end plate of the caudal vertebra.

Clinical examination, showed that all cats lost voluntary motor functions and pain sensation in the tail. Urinary incontinence was detected in 5 out of 8 cats. Only 1 of 5 cats with urinary incontinence also did not have perianal and perineal reflexes.

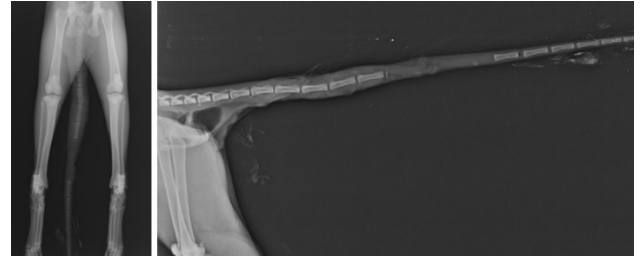
According to radiographic findings, the reason for tail amputation in five cats was luxation and an elongated space in the end plate fracture. In the other three cats, medical treatment was applied with cage rest. In the controls at the end of the second week, improvement was achieved in 7 cats, while urinary incontinence continued in only one. Although using bethanechol and alfuzosin partially relieved this cat, no permanent improvement was achieved. Although this cat was cared for in this way from 6 months to 2.5 years old, it was eventually requested to be euthanized by the family.



**Figure 1.** C1 vertebral fracture. A case in which cage rest and medical treatment were applied.



**Figure 2.** A case of sacrococcygeal luxation. The tail was amputated and no urine leakage or dripping was observed.



**Figure 3.** A case of end plate fracture in the tail vertebrae.

## Discussion and Conclusion

Tail-pulling injuries are seen chiefly in traffic accidents. It is thought to develop when the body moves when the cat's tail is pinched in the accident. In this context, coccygeal fractures and/or dislocations, and caudal sacral fractures are also considered under tail pulling injury. Because all of these can cause similar clinical symptoms and therefore need to be handled similarly (Davies and Walmsley, 2012; Flegel, 2016). All our cases had a traumatic history. Among these, traffic accident (3 cases) was more common, but it was also caused by the force of the cat when the tail was compressed (5 cases). Tail-pulled injuries with spinal trauma were not included in the case selection. Cats with another fracture with tail pull injuries were not restricted, but these eight cats did not have a second orthopedic or neurological disorder.

A tail pull injury may be a single post-traumatic lesion, but it should be remembered that it may be associated with orthopedic or soft tissue trauma. Tail pull injuries can sometimes be associated with pelvic fractures/sacroiliac separation, hindlimb fractures, spine fractures, lung contusions, pneumothorax, or head injuries (Davies and Walmsley, 2012, Flegel, 2016). Therefore, trauma should be considered in tail-pulling injuries, and chest radiographs should be taken and evaluated for additional lesions. Similarly, the hind leg or pelvis should be carefully examined (Caraty et al., 2018; Flegel, 2016). Tail-pulling injury was alone in all cases included in our study. Cats exposed to trauma will likely experience the conditions described above, along with a tail pull injury. However, the small number of cases (8 cats) in our study and the fact that five of them had a history of compression does not change the situation. Therefore, it should be evaluated regarding thorax and head trauma as well as other orthopedic problems.

In coccygeal spinal cord injuries, it is expected to cause sensory and motor defects only in the tail. However, tail-pulling injuries can cause significant traction on nerve roots. Also, sacral and caudal lumbar spinal segments may be affected (Caraty et al., 2018; Flegel, 2006). Therefore, hindlimb motor dysfunction and voiding disorders may be common (Barnes, 2020; Flegel, 2016, Granger et al., 2020). Depending on the severity of the traction, spinal cord segments may be affected. When the pelvic nerve (S1–3) is affected, a "drooping tail" condition occurs (Flegel, 2006; Gandini, 2017). However, voiding disorders resulting from impaired innervation of the bladder detrusor muscle and urethra are more critical for the long-term prognosis of the cat (Barnes, 2020; Flegel, 2006; Gandini, 2017; Granger et al.,

2020). Therefore, the pudendal nerve should also be evaluated (Flegel, 2016; Tatton et al., 2009). In our study, conditions other than tail-pulling injury were investigated in all cats who were examined in general. After head and chest trauma evaluation, an orthopedic examination was performed. After ruling out other conditions, he focused on the tail pull injury. In this context, in the neurological evaluation, tail voluntary motor function and tail pain perception evaluation were performed for the somatic caudal nerve. Perianal and perineal reflexes were evaluated for pudendal nerve evaluation.

The classification method for tail pull injuries in cats, described in previous studies (Brooks, 2021; Grierson, 2011; Smeak and Olmsteas, 1985), has provided great convenience. The results obtained from our study were consistent with this classification. Only one case had urinary leakage and tail amputation was not performed in this case. Moreover, it was grade V according to the classification.

Therapeutic options include medical treatment and different surgical approaches (Bernasconi et al., 2001; Brooks, 2021; Davies and Walmsley, 2021; Flegel, 2016). In many cases, when detrusor tone decreases and/or urethral sphincter tone increases, the bladder cannot be fully emptied as a result. Both of these conditions are treatable. Bethanechol (cholinergic) improves bladder detrusor muscle tone (Brooks, 2021; Davies and Walmsley, 2021; Flegel, 2016). Agents such as alfuzosin ( $\alpha$ 1 blocker), phenoxybenzamine (a non-selective alpha blocker), prazosin ( $\alpha$ 1 blocker) or acepromazine, diazepam (striated muscle relaxant) are recommended to reduce urethral sphincter tone (Davies and Walmsley, 2012; Flegel, 2016). In our study, cats with grade IV (3 cats) and grade V (1 cat) were supported with medical treatment. While only bethanechol was given to grade IV cats, alfuzosin was used with bethanechol for grade V. However, there was no radical improvement in one cat in grade V. The other seven cats recovered entirely at the end of the second week.

There are two different considerations for the decision to amputate the tail. The first is that a paralyzed tail will be useless to the cat. In addition, the tail in this condition is contaminated with urine and feces and may cause skin reactions (Brooks, 2016; Brooks, 2021; Caraty et al., 2018; Tatton et al., 2009). Second, it is believed that if there are still a few intact nerve sheaths, a paralyzed tail can exert sustained traction on the sacral and lumbar spinal segments due to its weight. This constant traction can cause additional injury to the spinal cord. If there is a large gap fracture/dislocation, it is necessary to amputate the tail, assuming that no nerve survives such traction (Caraty et al., 2018; Flegel, 2016). In our study, amputation was performed in cases with slack due to fracture or luxation. In other cases, cage rest was recommended.

As a result, after tail trauma in cats, the trauma should be evaluated as a whole and other conditions, such as possible thoracic and pelvic trauma should be investigated. There may be conditions such as pain in the tail or not using the tail. However, amputation should not be considered if there is no gap due to fracture or luxation. We believe that

the results of this study and 8 cases with tail pull injuries will contribute to clinical practice.

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

### Ethical Approval

This study was approved by the Dicle University Health Sciences Application and Research Center Local Ethics Committee with the number E-35582840-020-471830.

### Funding

Any project does not support this work.

### 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: EÇ, SY

Design: EÇ, SY

Control/Supervision: EÇ, SY, SA, BEK

Data Collection and Processing: EÇ, SY, SA, BEK, NS, ŞH

Analysis and Interpretation: EÇ, SY

Literature Review: EÇ, SY

Writing the Article: EÇ

Critical Review: EÇ, SY, SA, BEK

### References

- Barnes D, 2020: Tail pull injury in cats. *VETcpd*, 7 (3): 36-37.
- Bernasconi C, Grundmann S, Montavon PM, 2001: Simple techniques for the internal stabilization of fractures and luxations in the sacrococcygeal region of cats and dogs. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 143 (6): 296-303.
- Brooks W, 2021: Tail pull injuries in cats. <https://veterinarypartner.vin.com/default.aspx?pid=19239&id=4951820> Erişim tarihi: 21.03.2023.
- Caraty J, Hassoun R, Meheust P, 2018: Primary stabilisation for tail avulsion in 15 cats. *J Small Anim Pract*, 59: 22-26.
- Couper E, De Decker S, 2020: Evaluation of prognostic factors for return of urinary and defecatory function in cats with sacrocaudal luxation. *J Feline Med Surg*, 22 (10): 928-934.
- Davies E, Walmsley G, 2012: Management of tail pull injuries in cats. *In Practice*, 34: 27-33.
- Flegel T, 2016: Tail-pull injuries in the cat - diagnosis, treatment, and prognosis. 41<sup>st</sup> World Small Animal Veterinary Association Congress Proceedings, Sept 27-30, Cartagena, Colombia.
- Gandini G, 2017: Bladder management of the neurologic cat. [http://simposios.abnv.com.br/wp-content/uploads/2017/08/Management\\_of\\_the\\_bladder\\_in\\_the\\_neurologic\\_cat.pdf](http://simposios.abnv.com.br/wp-content/uploads/2017/08/Management_of_the_bladder_in_the_neurologic_cat.pdf) Erişim tarihi: 27.03.2023.
- Granger N, Olby NJ, Nout-Lomas YS, CANSORT-SCI, 2020: Bladder and bowel management in dogs with spinal cord injury. *Front Vet Sci*, 7: 583342.

Grierson J, 2011: Tail pull injury management in cats: treatment methodologies. *VetTimes*, April 25. [https://f01.justanswer.com/DrChristheVet/881d6a5e-6ee7-4884-b238-b89d05ad21d9\\_tail-pull-injury-management-in-cats-treatment-methodologies.pdf](https://f01.justanswer.com/DrChristheVet/881d6a5e-6ee7-4884-b238-b89d05ad21d9_tail-pull-injury-management-in-cats-treatment-methodologies.pdf) Erişim Tarihi: 21.03.2023.

Lanz O, 2002: Lumbosacral and pelvic injuries. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 32: 949-62.

Meeson R, Corr S, 2011: Management of pelvic trauma, neurological damage, urinary tract disruption and pelvic fractures. *J Feline Med Surg*, 13: 347-361.

Smeak D, Olmstead M, 1985: Fracture/luxations of the sacrococcygeal area in the cat: a restrospective study of 51 cases, *Vet Surg*, 14: 319-324.

Tatton B, Jeffery N, Holmes M, 2009: Predicting recovery of urination control in cats after sacrocaudal injury: A prospective study. *J Small Anim Pract*, 50 (11): 593-596.



## The Isolation and Examination of the Host Specificity of Local Bacteriophages for Use Against *Brucella abortus*

Songül ÖTKÜN<sup>1,a,\*</sup>, Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK<sup>2,b</sup>, Ahmet Murat SAYTEKİN<sup>2,c</sup>

<sup>1</sup>Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Klinik Öncesi Bilimler Bölümü, Siirt, Türkiye.

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Klinik Öncesi Bilimler Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-2736-953X

<sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-0377-2650

<sup>c</sup>ORCID: 0000-0001-7486-8054

Received: 06.05.2023

Accepted: 31.05.2023

**How to cite this article:** Ötkün S, Erdenliğ Gürbilek S, Saytekin AM. (2023). The Isolation and Examination of the Host Specificity of Local Bacteriophages for Use Against *Brucella abortus*. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 80-85, DOI:10.31196/huvfd.1293366.

**\*Correspondence:** Songül ÖTKÜN

Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Klinik Öncesi Bilimler Bölümü, Siirt, Türkiye.

e-mail: [songulotkun@yahoo.com](mailto:songulotkun@yahoo.com)

Available on-line at:

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Abstract:** Bacteriophages are viruses that infect bacteria. Although their effects on bacteria have been known for many years, the discovery of antibiotics has limited the widespread use of bacteriophages against bacterial infections. However, it is now essential to reconsider using phage therapies due to antimicrobial-resistant bacteria and uncontrolled bacterial zoonotic diseases becoming a global problem. This study aimed to isolate lytic phages against *B. abortus*, the most common agent that causes bovine brucellosis, which has become a worldwide animal and public health problem. This performed isolation is from cattle farms known to be previously or currently infected, and the study also evaluates the lytic effects of these phages on *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* biotypes, *B. ovis* and *B. neotomae* and *B. abortus* field isolates in our culture collection. In this process, seven local brucella-specific phages were identified by evaluating 112 samples via general phage isolation and purification. The lyticity of the isolated bacteriophages were analyzed with international reference: *B. abortus* (bv 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9), *B. melitensis* (bv 1, 2, 3), *B. suis* (bv 1, 2, 3, 4, 5) biovars, *B. ovis*, *B. neotomae* and *B. abortus* field strains (n:20). It was found that 85% of *B. abortus* strains produced a lysis pattern like Tbilisi  $\Phi$  through local phages. In terms of the lysis results, three different *B. abortus* specific phages were isolated (98  $\Phi$ , 104  $\Phi$ , and (P35, P70, P94/1, P94/2, P94/3) phages). It is thought that the applying cocktails prepared from these phages to fight against brucellosis will significantly contribute to controlling the disease. Since 15% of the field isolates were found to be rough strains, it is recommended that R/C  $\Phi$  are included in the prepared cocktails.

**Keywords:** Bacteriophage, *Brucella abortus*, Brucellosis, Phage therapy.

### *Brucella abortus*'a Karşı Yerel Bakteriyofaj İzolasyonu ve Konakçı Spesifitesinin Değerlendirilmesi

**Özet:** Bakteriyofajlar bakterileri enfekte eden viruslardır. Bakteriler üzerindeki etkileri uzun yıllardır bilinmekle birlikte bakteriyel enfeksiyonlara karşı yaygın olarak kullanımı antibiyotiklerin keşfi nedeniyle arka planda kalmıştır. Küresel bir sorun haline gelen antimikrobiyal dirençli bakteriler ve kontrol altına alınamayan bakteriyel zoonotik hastalıklar nedeniyle günümüzde faj terapileri bir tercihten ziyade zorunluluk haline gelmeye başlamıştır. Bu çalışmada, ülkemizde ve dünyanın birçok ülkesinde önemli bir hayvan ve halk sağlığı sorunu olan sığır brusellosisinin en yaygın etkeni olan *B. abortus*'a karşı daha önce ya da halen enfekte olduğu bilinen sığır çiftliklerinden litik faj izolasyonunun yapılması ve bu fajların *B. abortus*, *B. melitensis* *B. suis* biyotiplerinde, *B. ovis* ve *B. neotomae*'de ve kültür koleksiyonumuzda bulunan *B. abortus* saha izolatlarında litik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Genel faj izolasyon ve saflaştırma yöntemleri uygulanarak 112 örnekten yedi adet yerel *Brucella* spp. spesifik faj tespit edildi. İzole edilen bakteriyofajlar, uluslararası referans *B. abortus* (bv 1,2,3,4,5,6,9), *B. melitensis* (bv 1,2,3), *B. suis* (bv 1,2,3,4,5) biyovarları, *B. ovis*, *B. neotomae* ve *B. abortus* saha suşları (n:20) ile litik etkinlikleri yönünden analiz edildi. *B. abortus* suşlarının %85'i yerel fajlarla Tbilisi  $\Phi$ 'na benzer lizis modeli meydana getirdi. Çalışma sonunda şekillenen lizis tablosu dikkate alındığında, 3 farklı *B. abortus* spesifik faj izolasyonunun yapıldığı anlaşıldı [98  $\Phi$ , 104  $\Phi$ , ve (P35, P70, P94/1, P94/2, P94/3) fajları]. Bu fajlardan hazırlanan faj karışımlarının brusellosis ile mücadelede uygulanmasının hastalığın kontrolüne önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Çalışmada saha izolatlarının %15'i rough suşlar olarak tespit edildiğinden hazırlanan faj kokteyllerinin içine R/C  $\Phi$ 'nın katılmasının da yerinde bir karar olacağı kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Bakteriyofaj, *Brucella abortus*, Brusellosis, Faj terapisi.

## Introduction

Bacteriophages, which are viruses that infect bacteria, are infectious particles that, like other viruses, have at least two components (nucleic acid and protein) (Campbell, 2003). Although their effects on bacteria were discovered as early as the 19th century, the discovery of antibiotics has reduced interest in bacteriophages (phages) in the scientific community (Jurač et al., 2019). However, the alarming increase in multi-antibiotic-resistant microorganisms has necessitated a renewed focus on phages (García et al., 2019; Ling et al., 2022). Phages, which significantly impact the biocontrol of microbial populations of bacteria in different environments, are naturally "green" applications as they only affect target microorganisms (Issabekov et al., 2022). There is also a great deal of potential for the use of phages in the treatment of bacterial infections, as well as in disinfection and the detection and categorizing of pathogens (Erdenliğ-Gürbilek et al., 2022; Issabekov et al., 2022; Phongtang et al., 2019; WOA, 2022). The importance of phage therapies in the fight against bacterial diseases is increased by how bacteriophages demonstrate strong lytic effects, specifically against many target bacteria, and their ability to multiply exponentially in the infected environment (Aslam and Schooley, 2019).

Brucellosis, an important zoonotic bacterial disease, has become a global problem due to the difficulty in eradication. The problem's severity is apparent by the fact that the vast majority of animals globally are infected. It is, therefore, essential that the problem of brucellosis be tackled in whatever way possible, including the use of phage therapy (Khurana et al., 2021; Pappas et al., 2006) and, more

specifically, through the targeted infection of *Brucella* bacteria with phages. It has been standard practice for many years to identify classical *Brucella* species that show host specificity (Flores et al., 2012; Projahn et al., 2020; WOA, 2022). Furthermore, the self-replicating and self-limiting nature of these phages, as well as the fact that they do not harm regular flora, makes lytic bacteriophages a practical, reliable, and cost-effective alternative for brucellosis control (Mohan et al., 2020).

This study aimed to isolate local bacteriophages from samples taken from areas with a high probability of phage presence. These areas include litter material, fecal pits and sewage samples, and range soil from cattle farms. Current or defeated *Brucella* infection was detected, and the lytic effect of the isolated phages on the World Organization for Animal Health (WOAH) reference *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* biotypes, *B. ovis* and *B. neotomae* and *B. abortus* field isolates in our culture collection was determined.

## Materials and Methods

Reference and field *Brucella* strains (Table 1) and phages used in the study were obtained from the laboratory strain collection of the Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Harran University. The materials used in the study consisted of samples taken from 112 different regions of 27 cattle farms. This study is not subject to HADYEK permission by Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees".

**Tablo 1.** *B. abortus* field strains included in the study and their origin.

No	Strain	Host	Region	Material	Year
1	<i>B. abortus</i>	Cattle	İğdır	Milk	2022
2	<i>B. abortus</i>	Cattle	Şanlıurfa/Akçakale	Milk	2022
3	<i>B. abortus</i>	Cattle	Diyarbakır	Fetus	2021
4	<i>B. abortus</i>	Cattle	Diyarbakır	Fetus	2021
5	<i>B. abortus</i>	Cattle	Şanlıurfa/Haliliye	Milk	2022
6	<i>B. abortus</i>	Cattle	Şanlıurfa/Viranşehir	Milk	2022
7	<i>B. abortus</i>	Cattle	İstanbul	Vaginal swap	2017
8	<i>B. abortus</i>	Cattle	Şanlıurfa/Viranşehir	Milk	2022
9	<i>B. abortus</i>	Cattle	Şanlıurfa/Viranşehir	Milk	2022
10	<i>B. abortus</i>	Cattle	Bursa	Vaginal swap	2022
11	<i>B. abortus</i>	Cattle	İğdır	Vaginal swap	2022
12	<i>B. abortus</i>	Cattle	İğdır	Milk	2022
13	<i>B. abortus</i>	Cattle	Konya	Milk	2022
14	<i>B. abortus</i>	Cattle	Bursa	Milk	2022
15	<i>B. abortus</i>	Cattle	Bursa	Milk	2022
16	<i>B. abortus</i>	Cattle	Bursa	Abomasal fluid	2022
17	<i>B. abortus</i>	Cattle	Bursa	Abomasal fluid	2022
18	<i>B. abortus</i>	Cattle	Bursa	Vajinal swap	2022
19	<i>B. abortus</i>	Cattle	İzmir	Milk	2022
20	<i>B. abortus</i>	Cattle	Kars	Abomasal fluid	2022

**Bacteriophage isolation and proliferation:** Phages were isolated from environmental samples from cattle farms where brucellosis had previously been detected. Phage isolation was performed in our laboratory through a modified method based on classical methods used for this purpose (Sambrook et al., 1989). In this process, fecal litter samples were diluted 1/10 with LB (Luria Bertani) broth, homogenized, and centrifuged at 6000 rpm for 20 minutes. The supernatant obtained was first passed through 0.45 µm filters, followed by 0.2 µm filters, and the sterilized filtrate was used as a phage source. *B. abortus* S19 vaccine strain, which has low virulence regarding laboratory personnel and environmental safety, was used as the host. A suspension of  $1 \times 10^9$  CFU bacteria per milliliter of the host strain was inoculated onto Tryptic Soy Agar (TSA). After the agar surface had dried, 250 µl of sterile phage filtrate was added and spread on the agar surface with a sterile loop. After the agar surface had again dried, the petri dishes were incubated at 37°C for one day. After incubation, passages were continued until significant lysis was observed in the petri dishes. Bacteria and phage combinations were collected from the surface of the lysis petri dishes with LB broth. The collected suspension was centrifuged at 6000 rpm for 20 minutes, and the supernatant was sterilized by first passing it through 0.45 µm filters, followed by 0.2 µm filters. The next stage was phage purification.

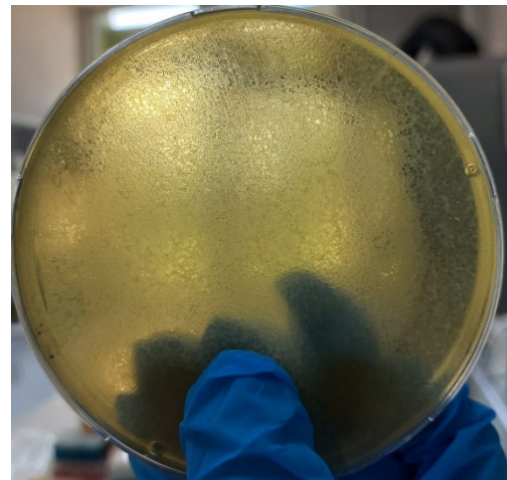
**Purification of *Brucella* phages:** In this stage, sterile phage filtrates were processed using an agar-overlay method to detect the phage plaques of bacteriophages. This method necessitated the preparation of 3 ml of soft agar (0.8 g agar, 2 g NaCl, 2 g Peptone, 150 µl CaCl<sub>2</sub>), which was then poured into each TSA petri dish. The prepared agar was kept in a 40°C double-boiler to prevent solidification, and 150 µl of phage solution and 100 µl of *B. abortus* S19 bacterial suspension were added. The mixture was then immediately poured onto the TSA petri dish, spread, and allowed to freeze. Petri dishes were incubated overnight at 37°C, and the phage plaques were evaluated after incubation. The single plate isolation method was repeated three times in succession to obtain pure bacteriophages. For this purpose, phage plaques obtained by the double agar method were collected from singular sites into a sterile tube with a sterile pipette tip. Three ml of LB liquid medium and 250 µl of bacterial suspension containing  $1 \times 10^9$  CFU *B. abortus* S19 per milliliter were added. After waiting for 15 minutes for phage-bacteria adsorption, 10 ml of LB liquid medium was added. The mixture was then incubated overnight at 37°C, after which the mixture was centrifuged at 6000 rpm for 10 minutes, and the upper liquid phase was passed through a 0.22 µm filter to prepare a pure and sterile phage solution. The lytic effect of these phage solutions on *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis* species and biotypes was investigated. In addition, the lytic effect of Tbilisi Φ on *B. suis*, and *B. neotomae* species, which is known to occur on high titers, was also investigated. The isolated phages were additionally tested on different field *B. abortus* strains to detect possible differences. All phages isolated in the study were used in routine test dilution (RTD) (Alton et al., 1988), and ten-fold dilutions of phages were made for this purpose. The

endpoint of complete lysis was determined as the routine test dilution of the relevant phage.

## Results

Seven phages were selected for evaluation due to the phage detection (Figure 1) and purification procedures using the *B. abortus* S19 vaccine strain from 112 samples taken from 27 cattle enterprises included in the study as hosts. Three of the selected phages were detected in samples from extremely different facilities of the same enterprise. The phages used in the study were coded as P35, P70, P94/1, P94/2, P94/3, P98, and P104.

Izatnagar (Iz) and Tbilisi (Tb) phages were used as reference control to evaluate the lytic effects of phages detected in and purified from the *B. abortus* S19 host. Reference strains used in the study were: *B. abortus* 544 (bv 1), *B. abortus* 86/8/59 (bv 2), *B. abortus* Tulya (bv 3), *B. abortus* 292 (bv 4), *B. abortus* B3196 (bv 5), *B. abortus* 870 (bv 6), *B. abortus* C68 (bv 9), *B. melitensis* 16M (bv 1), *B. melitensis* 63/9 (bv 2) *B. melitensis* Ether (bv 3), *B. suis* 1330 (bv 1), *B. suis* Thomsen (bv 2), *B. suis* 686 (bv 3), *B. suis* 40 (bv 4), *B. suis* 513 (bv 5), *B. ovis* 63/290, *B. neotomae* 5K33 strains and 20 strains of field *B. abortus* isolated from samples taken from eight different provinces (Table 1).



**Figure 1.** Densities of bacteriophage plaques.

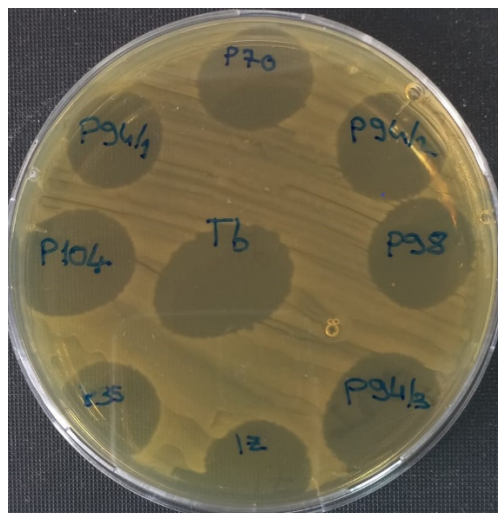
At the end of 48 hours of incubation at 37°C in a microaerophilic atmosphere, local bacteriophages formed round and transparent lysis areas in 17 of the 20 *B. abortus* strains included in the study. All isolated phages produced the same lysis areas (Figure 2) as the Tb Φ in *B. abortus* strains (bv 1,2,3,3,4,4,5,6,9 and 17 field strains). The lysis induced by local and reference phages on the reference strains and field strains used are shown in Table 2. The reference and local phages also showed full lytic effects on *B. suis* bv 1, 2 strains and *B. neotomae*. However, *B. suis* bv 3 and *B. suis* bv 5 were not lysed by Tb, P98, and P104 phages, whereas they were fully lysed by Iz, P35, P70, P94/1, P94/2, and P94/3. *B. suis* bv 4 strain was lysed by all phages except P98 Φ. Local phages and Tb Φ did not produce lysis plaques



**Table 2.** Lytic effect of isolated *Brucella* phages and reference phages on *Brucella* strains. +: plaque formation, -: no lysis.

	P35	P70	P94/1	P94/2	P94/3	P98	P104	Tb	Iz	R/C
<i>B. abortus</i> 544	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i> 86/8/59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i> Tulya	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i> 292	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i> B3196	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i> 870	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i> C68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. melitensis</i> 16M	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. melitensis</i> 63/9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. melitensis</i> Ether	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. suis</i> 1330	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. suis</i> Thomsen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. suis</i> 686	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>B. suis</i> 40	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>B. suis</i> 513	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>B. neotomae</i> 5K33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. ovis</i> 63/290	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>B. abortus</i> field strains (1-10,12-15,17,19,20)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i> field strains (11,16,18)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

in *B. melitensis* (bv 1,2,3) strains. Similarly, the *B. ovis* strain was not lysed by any of the phages used in the study. While 3 of the *B. abortus* field strains were not lysed by any phage, they were lysed by R/C  $\Phi$ , which is specific to rough strains.



**Figure 2.** Analysis of local and reference phages via *B. abortus* field strain (No:2).

## Discussion

The main causative agent of bovine brucellosis is biovars of *B. abortus*. This disease causes huge losses worldwide due to abortions, low yields, import restrictions, and public health problems (Khurana et al., 2021; WOA, 2022). As the socio-economic effects of brucellosis are overwhelming, the need for practical and low-cost solutions

has become imperative, especially in underdeveloped countries (Khurana et al., 2021; Prajapati et al., 2014). Phage therapies appear to be one such solution, as they are cost-effective and potentially adaptable to controlling bacterial diseases (Saxena, 2021). Support for the therapeutic efficacy of *Brucella* phages was provided by Prajapati et al. (2014), who found that phage therapy reduced colonization in mouse spleens. The researchers also reported that in cases where antibiotic treatment is not recommended in animals due to the expense, phage therapies could be effective in treating pregnant animals and those at risk of infection.

Lytic bacteriophages are unique microorganisms that have therapeutic and prophylactic properties (Issabekov et al., 2022), while bovine brucellosis is a bacterial disease that can potentially be controlled using lytic bacteriophages (Shaneen et al., 2021). The isolation of lytic phages that can be used against *B. abortus* has been performed in various studies conducted in many countries (Prajapati et al., 2014; Saxena, 2021; Shaneen et al., 2021). As far as can be ascertained, the present study is the first study in Turkey on the isolation of lytic phages to combat *B. abortus*. Unlike many other studies (Chachra et al., 2012; Gupta and Saxena, 2017; Shaneen et al., 2021), the current study isolated 7 local phages and evaluated the lytic effects of these phages on 20 *B. abortus* field strains isolated from samples taken from 8 different provinces, while referencing *B. abortus*, *B. suis* and *B. melitensis* biovars, and *B. neotomae* and *B. ovis* strains.

Smooth *B. abortus* strains are susceptible to Tbilisi, Izatnagar, Berkeley2, and Weybridge phages (Li et al., 2019). In our study, in which *B. abortus* S19, a smooth and vaccine strain that is relatively safer to field strains, was used as the host, seven phages were isolated from cattle facilities with a history of brucellosis. There are many studies

reporting successful isolation of lytic phages for use against *Brucella* bacteria, most of these phages isolated having lytic effects on *B. abortus*. These isolates are closely related to Tb  $\Phi$  (Morris et al., 1973; Teydoradze et al., 2015). The lytic effects of Tb  $\Phi$ , an international reference phage, on *B. abortus* strains is well known (Shaneen et al., 2021; WOA, 2022). In the present study, seven local phage isolations and three different *B. abortus* specific phage isolations were performed compared to Tbilisi  $\Phi$  in terms of host specificity. Of these, 98  $\Phi$  did not lyse *B. suis* biovars, except *B. suis* bv 1 and 2, while 104  $\Phi$  only lysed *B. suis* bv 1, 2 and 4 biovars. These two phages were thus considered to be two separate phages. Since the other test bacteriophages lysed all reference and test strains, except *B. ovis* and *B. melitensis* biovars and rough *B. abortus* strains, they are thought to be the same phage. (Table 2). *Brucella* phages are generally similar in morphology, antigen reactions, and various physicochemical properties (Flores et al., 2012).

Izatnagar  $\Phi$  was found to be lytic in tests performed on many smooth *Brucella* species (WOA, 2022). In the present study, Iz  $\Phi$  showed lytic effects on the international reference smooth strains of *B. melitensis* (bv 1,2,3), *B. suis* (1,2,3,4,5), *B. abortus* (1,2,3,4,5,6,9) and *B. neotomae*. *B. ovis* and three rough *B. abortus* field strains were lysed as expected by R/C  $\Phi$ , which is lytic for rough strains. In their study that successfully lysed *B. suis* 1330 with Tb and Iz phages, Hammerl et al. (2017) reported that the published data on the susceptibility of *B. suis* 1330 (bv 1) to Tb  $\Phi$  is inconsistent. Similarly, in the present study, Tb and Iz phages caused *B. suis* 1330 to form lysis plaques, while complete lysis was also achieved with local phages. Hammerl et al. (2017) reported that *B. suis* 686, 40, and 513 strains were not lysed by Tb  $\Phi$ . In this study, *B. suis* 686 and 513 were not lysed by Tb  $\Phi$  and local isolates P98 and P104 phages while *B. suis* 40 strain produced phage plaques in all phages included in the study except 98 $\Phi$ . The authors emphasize that there may be many reasons for the inconsistency of the results and recommend that the genomes of the examined phages should be sequenced. The present study focused on isolating local *Brucella* phages in the first stage, and thus represents the first important step for further analysis. Hence, there is a need for other studies analyzing the examined strains, which were phylogenetically isolated and evaluated as three different groups of *B. abortus* phages.

## Conclusion

In this study, three different local phages to be used against *B. abortus* were isolated. In this era where the use of bacteriophages is becoming necessary in the fight against bacterial problems, isolations of local phages that can be used against bacterial agents are of critical importance. However, since phages are not only specific to a certain but also to multiple species and strains, it is thought that the use of bacteriophage cocktails in the fight against brucellosis will make significant contributions to the control of the disease. Since some *Brucella* isolates may, for various reasons, transform into rough colony morphologies, it was concluded that it is important for R/C  $\Phi$  to be added to phage cocktails.

It is felt that further molecular analyses on isolated *Brucella* phages will pave the way for more prophylactic and therapeutic use of phages in the fight against brucellosis.

## Conflict of Interest

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

## 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".

## Similarity Rate

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

## Author Contributions

Motivation / Concept: SEG

Design: SÖ, SEG, AMS

Control/Supervision: SEG, AMS

Data Collection and / or Processing: SÖ, SEG, AMS

Analysis and / or Interpretation: SÖ, SEG, AMS

Literature Review: SÖ, SEG, AMS

Writing the Article SÖ, SEG, AMS

Critical Review: SEG

## References

- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, 1988: Techniques For The Brucellosis Laboratory. Paris: INRA.
- Aslam S, Schooley RT, 2019: What's old is new again: bacteriophage therapy in the 21st century. *Antimicrob Agents Chemother*, 64 (1), e01987-19.
- Campbell A, 2003: The future of bacteriophage biology. *Nat Rev Genet*, 4 (6), 471-477.
- Chachra D, Kaur H, Chandra M, Saxena HM, 2012: Isolation, electron microscopy and physicochemical characterization of a brucella phage against *Brucella abortus* vaccine strain S19. *Internet J Microbiol*, 10 (2), 1-7.
- Flores V, López-Merino A, Mendoza-Hernandez G, Guarneros G, 2012: Comparative genomic analysis of two brucella phages of distant origins. *Genomics*, 99 (4), 233-240.
- García R, Latz S, Romero J, Higuera G, García K, Bastías R, 2019: Bacteriophage production models: an overview. *Front Microbiol*, 10, 1187.
- Gupta V, Saxena HM 2017: Isolation and characterization of BpL1, a broad acting lytic bacteriophage against *Brucella*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 6 (11), 2486-2496.
- Erdenliğ-Gürbilek S, Arserim NB, Tel OY, 2022: Determination of serogroup and lytic activities of bacteriophages isolated from phage plaques in *Staphylococcus aureus* cultures identified from sheep milk with mastitis. *Indian J of Anim Res*, 1, 4.
- Hammerl JA, Göllner C, Jäckel C, Scholz HC, Nöckler K, Reetz, J, Dahouk, Hertwig S, 2017: Genetic diversity of *Brucella*

- reference and non-reference phages and its impact on *Brucella*-typing. *Front Microbiol*, 8, 408.
- Issabekov SS, Syrym NS, Sambetbayev AA, Alikhanov KD, Yespembetov BA, 2022: Prospects of bacteriophage collections in disinfectant applications. *Veterinary World*, 15 (1), 220-231.
- Jurač K, Nabergoj D, Podgornik A, 2019: Bacteriophage production processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103 (2), 685-694.
- Khurana SK, Sehrawat A, Tiwari R, Prasad M, Gulati B, Shabbir MZ, Chhabra R, Karthik K, Patel SK, Pathak M, Yatoo MI, Gupta K, Sah R, Chaicumpa, W 2021: Bovine brucellosis—a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 41 (1), 61-88.
- Li XM, Kang YX, Lin L, Jia EH, Piao DR, Jiang H, Zhang CC, He J, Chang YF, Guo XK, Zhu, Y, 2019: Genomic characterization provides new insights for detailed phage-resistant mechanism for *Brucella abortus*. *Front Microbiol*, 10, 917.
- Ling H, Lou X, Luo Q, He Z, Sun M, Sun J, 2022: Recent advances in bacteriophage-based therapeutics: Insight into the post-antibiotic era. *Acta Pharm Sin B*, 12 (12), 4348-4364.
- Mohan A, Saxena HM, 2020: Effect of phage targeting therapy of brucellosis on host antibody response in cattle. *Phage (New Rochelle)*, 1 (4), 223-229.
- Morris JA, Corbel MJ, Phillip JIH, 1973: Characterization of three phages lytic for *Brucella* species. *J of Gen Virol*, 20 (1), 63-73.
- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV, 2006: The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis*, 6 (2), 91-99.
- Phongtang W, Choi GP, Chukeatirote E, Ahn J, 2019: Bacteriophage control of *Salmonella* Typhimurium in milk. *Food Sci Biotechnol*, 28, 297-301.
- Prajapati A, Ramchandran D, Verma H, Abbas M, Rawat M, 2014: Therapeutic efficacy of *Brucella* phage against *Brucella abortus* in mice model. *Vet World*, 7 (1), 34-37.
- Projahn M, Hammerl JA, Dieckmann R, Dahouk SA, 2020: A proof of principle for the detection of viable *Brucella* spp. in raw milk by qPCR targeting bacteriophages. *Microorganisms*, 8 (9), 1326.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory press, ABD.
- Saxena HM, 2021: Bacteriophage and its potential for therapeutic use in brucellosis among cattles. *Research & Reviews: J Vet Sci Technol*, 10 (2), 9–17.
- Shaheen AY, Sheikh AA, Rabbani M, Shehzad W, Abbas Z, Maqbool M, 2021: Isolation, propagation and biocontrol activity of indigenous bacteriophages against *Brucella abortus*. *Intl J Agric Biol*, 25, 1066–1074.
- Tevdoradze E, Farlow J, Kotorashvili A, Skhirtladze N, Antadze I, Gunia S, Balarjishvili, Kvachadze L, Kutateladze M, 2015: Whole genome sequence comparison of ten diagnostic *Brucella* phages propagated on two *Brucella abortus* hosts. *Viral J*, 12 (1), 1-11.
- World Organisation for Animal Health, 2022: Chapter 3. 1. 4. Brucellosis (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Paris.



## Investigation of the Role of Some Selected Virus Species in Abnormality of Calves

Sümeyye BABACAN<sup>1,a,\*</sup>, Hasan ABAYLI<sup>2,b</sup>, Şükrü TONBAK<sup>2,c</sup>, Kenan Çağrı TÜMER<sup>3,d</sup>, Eren POLAT<sup>4,e</sup>, Mustafa İSSİ<sup>1,f</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, Elazığ, Türkiye.

<sup>2</sup>Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, Elazığ, Türkiye.

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Kastamonu, Kastamonu, Türkiye.

<sup>4</sup>Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, Elazığ, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0001-8007-8315

<sup>b</sup>ORCID: 0000-0003-2116-105X

<sup>c</sup>ORCID: 0000-0003-2822-560X

<sup>d</sup>ORCID: 0000-0002-2861-0236

<sup>e</sup>ORCID: 0000-0002-3999-1310

<sup>f</sup>ORCID: 0000-0003-4416-4130

Received: 21.03.2023

Accepted: 08.06.2023

**How to cite this article:** Babacan S, Abaylı H, Tonbak Ş, Tümer KÇ, Polat E, İssi M. (2023). Investigation of the Role of Some Selected Virus Species in Abnormality of Calves. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 86-92, DOI:10.31196/huvfd.1268263.

**\*Correspondence:** Sümeyye BABACAN

Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Firat, Elazığ, Türkiye.

e-mail: [sbabacan@firat.edu.tr](mailto:sbabacan@firat.edu.tr)

Available on-line at:

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Abstract:** Early embryonic death, fetal resorption, fetal mummification/maceration, abortion, and abnormalities are some of the causes of losses in farm animals. In this study, it was aimed to make recommendations to clinician veterinarians by investigating the presence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV), Schmallenberg virus (SBV), Akabane virus (AKAV), and bovine herpesvirus-1 (BHV-1) viruses in calves with congenital anomalies. A total of 34 calves of different breeds and sexes, between 1 day and 2 months of age which were brought to Firat University Animal Hospital for diagnosis and treatment and found to have congenital anomalies after a general clinical examination during visits to the neighboring villages, were included in the study. The abnormalities detected in the calves were as follows: Hydrocephalus, cerebellar hypoplasia, brahignati inferior, mandibular laterognathism, arthrogryposis, cheilognathopalatoschisis, coccygeal agenesis, atresia ani, bouleture/arçure, ocular and orbital deformities, dermoid cysts, miniature, renal and urinary system anomalies. PCR results showed pestivirus was detected in 6 of 34 (17.6%) calves with abnormalities. After sequencing, the expected PCR product (288 nucleotides) for pestivirus showed high identity (97% and above) to the BVDV-1 strain/isolates in the GenBank. In conclusion, although the primary purpose of cattle breeding is high meat and milk yield, it is also very important to continue the production process with healthy newborn calves. For this reason, even if congenital anomalies are seen at a low rate in calves, they should not be underestimated as they will cause economic losses, and we believe that clinician veterinarians should not ignore these diseases.

**Keywords:** Calf, Congenital anomalies, Virus.

### Buzağı Anomalilerinde Seçilen Bazı Virüs Türlerinin Rolünün Araştırılması

**Özet:** Erken embriyonik ölüm, fetal rezorpsiyon, fetal mumyalama/maserasyon, abort ve anormallikler çiftlik hayvanlarında kayıpların nedenlerinden bazılarıdır. Bu çalışmada, kongenital anomalili buzağılarda sığır viral diyare virüsü (BVDV), schmallenberg virüsü (SBV), akabane virüsü (AKAV) ve sığır herpes virüsü-1 (BHV-1) virüslerinin varlığı araştırılarak klinisyen veteriner hekimlere önerilerde bulunulması amaçlanmıştır. Firat Üniversitesi Hayvan Hastanesi'ne teşhis ve tedavi için getirilen ve civar köylere yapılan ziyaretlerde genel klinik muayene sonrasında kongenital anomalisi olduğu belirlenen değişik ırk ve cinsiyetteki, 1 günlük ila 2 aylık yaş aralığında bulunan 34 buzağı çalışmaya alınmıştır. Buzağılarda tespit edilen anormallikler: hidrosefali, serebellar hipoplazi, brahignati inferior, mandibular laterognatizm, artrogripozis, cheilognatopalatoschisis, koksigeal agenezi, atresia ani, bouleture/arçure, oküler ve orbital deformiteler, dermoid kistler, minyatür, renal ve üriner sistem anomalileri. PCR sonuçlarına göre anomalili 34 buzağının 6'sında (%17,6) pestivirus tespit edildi. Sekanslamanın ardından pestivirus için beklenen PCR ürünü (288 nükleotit), GenBank'ta BVDV-1 suşu/izolatlarına yüksek özdeşlik (%97 ve üzeri) gösterdi. Sonuç olarak, sığır yetiştiriciliğinde birincil amaç yüksek et ve süt verimi gibi görünse de sağlıklı yeni doğan buzağılarla üretim sürecinin devam ettirilmesi de oldukça önemlidir. Bu nedenle buzağılarda doğumsal anomaliler düşük oranda görülse bile ekonomik kayıplara neden olacağı için hafife alınmaması ve klinisyen veteriner hekimlerin bu hastalıkları göz ardı etmemeleri gerektiğine inanıyoruz.

**Anahtar Kelimeler:** Buzağı, Kongenital anomali, Virüs.

## Introduction

Early embryonic death, fetal resorption, fetal mummification/maceration, abortion, and abnormalities are some of the causes of losses in farm animals (Doğan and Bilge Dağalp, 2017; Gül ve İssi, 2009; Gül et al., 2013; Gürçay et al., 2013; İssi et al., 2012; İssi et al., 2013). Congenital abnormalities, also called congenital malformation, congenital defects, or teratogenicity can be defined as structural or functional disorders that appear after birth (Aksoy, 2001; Belge et al., 2000). Although congenital abnormalities are rarely seen in farm animals, it is important that they cause economic losses and be transferred on to the next generations as hereditary (Belge et al., 2000; Berber and Sözdutmaz, 2013; Yurdakul 2020). Among the factors that cause these cases, the contribution of viruses is at a level that cannot be neglected (Berber and Sözdutmaz, 2013; Doğan and Bilge Dağalp, 2017; Gürçay et al., 2013; İssi et al., 2012; İssi et al., 2013; İssi et al., 2014). Viruses, which are also teratogenic infectious agents, often cause malformations by affecting the nervous and musculoskeletal systems (Tamer and Okur Gumusova, 2017; Vandeveldel et al., 2012). These malformations hydranencephaly, porencephaly, hypomyelination, demyelination, cerebellar hypoplasia, cerebellar dysplasia, and hydrocephalus in the nervous systems and are muscular atrophy and arthrogryposis in the musculoskeletal system (Maxie, 2015; Tamer and Okur Gumusova, 2017). Viral agents that cause congenital malformation as a result of fetal transplantation in cattle include bovine viral diarrhoea virus (BVDV), schmallenberg virus (SBV), akabane virus (AKAV), bluetongue virus (BTV) or aino virus (AV) (Agerholm, 2015). In addition to respiratory system infections, bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is known to cause genital tract infections and abortions (Doğan and Bilge Dağalp, 2017).

Bovine viral diarrhoea virus is a major pathogen associated with gastrointestinal, respiratory, and reproductive disorders of cattle worldwide. BVDV as an enveloped, small (about 40-60 nm) positive polarity RNA virus is a member of the genus Pestivirus, family *Flaviviridae* (MacLachlan and Dubovi, 2011). The International Committee on Virus Taxonomy has defined eleven species in the pestivirus genus (A to K). Pestivirus A (BVDV-1), Pestivirus B (BVDV-2), Pestivirus D (Border disease virus), Pestivirus H (HoBi-like pestivirus), Pestivirus I (Aydin-like pestivirus) have been reported in ruminant animals (King et al., 2012; King et al., 2018). BVDV-1 subtypes range from 1a to 1q, while BVDV-2 subtypes range from 2a to 2d. BVDV-3 (pestivirus H or HoBi-like pestivirus), a member of the pestivirus genus, has been identified in cattle and buffalo (Mishra et al., 2014). BVDV consists of two biotypes (cytopathic/non-cytopathic) according to the morphological character in cell culture (Fulton et al., 2000).

Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) is a member of the genus Varicellovirus in the subfamily *Alphaherpesvirinae*, *Herpesviridae* family. The BHV-1 genome is approximately 135 kb in size, enveloped, double-stranded DNA virus (Muylkens et al., 2007). BHV-1 has three different subtypes, BHV-1.1, BVH-1.2a, and BHV-1.2b, according to genetic

differences and varieties in clinical signs (Metzler et al., 1985). BHV-1.1 and BVH-1.2a cause respiratory and genital system disorders and abortions. BVH-1.2b is low pathogenic when compared with the other sub-types (Miller et al., 1991, Spilki et al., 2004).

AKAV and SBV which are enveloped and negative polarity RNA viruses are members of the Orthobunyavirus genus, which belongs to the *Peribunyaviridae* family. AKAV is closely associated with SBV viruses and causes reproductive disorders in cattle, sheep, and goats, as well as congenital abnormalities such as arthrogryposis-hydranencephaly (AH syndrome) (Kurogi et al., 1985; MacLachlan and Dubovi, 2016). SBV was first discovered in Germany in 2011 and has since affected nearly all of Europe (Lievaart-Peterson et al., 2015). Pestivirus and BHV-1 infections are important problems for Türkiye (Aslan et al., 2015; Berber and Sözdutmaz, 2013; İssi et al., 2012).

In this study, it was aimed to make recommendations to clinician veterinarians by investigating the presence of BVDV, SBV, AKAV and BHV-1 viruses in calves with congenital anomalies.

## Materials and Methods

**Ethical Approval:** The study was approved by the Firat University Experimental Animals Local Ethics Committee (Decision number: 2020/07).

**Clinical Specimens:** This study was carried out in the province of Elazığ, located in the eastern Anatolian region of Türkiye, in the second half of 2020. Brought to Firat University Animal Hospital for diagnosis and treatment, and found to have congenital anomalies after general clinical examination during visits to surrounding villages, they were classified as different races (25 Simmental, 4 Holstein, 2 Montafon, 2 East Anatolian Red, 1 Hybrid) and (28 male, 6 females) 34 calves aged between 1 day and 2 months were included in the study. It was learned from the anamnesis information that 18 of the animals included in the study were conceived by artificial insemination and 16 by natural insemination.

The abnormalities detected in the calves were as followed: Hydrocephalus (n:1), cerebellar hypoplasia (n:1), brahignati inferior (n:5), mandibular laterognathism (n:1), arthrogryposis (n:1), cheilognathopalatoschisis (n:2), coccygeal agenesis (n:2), atresia ani (n:4), bouleture/arçure (n:4), ocular and orbital deformities (n:7), dermoid cysts (n: 2), miniature (n:2), renal and urinary system anomalies (n:2).

Blood samples taken from the jugular vein of the calves included in the study were collected into anti-coagulant tubes (with EDTA). After the blood tubes were kept at +4 °C overnight, they were centrifuged at 1500 xg for 10 minutes and plasma was obtained. The obtained plasmas were transferred to sterile eppendorf tubes and stored at -20 °C until used.

**Viral Nucleic Acid Isolation:** Viral nucleic acid isolation from blood plasma was performed using the QIAamp MinElute Virus Spin kit (Qiagen, Germany) and strictly

following the kit's instructions for use. Finally, viral nucleic acids were collected in 100 µL of elution buffer and quantified by measuring in a NanoDrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher, USA).

**Reverse Transcription (RT) and Polymerase Chain Reaction (PCR):** AKAV, SBV, BVDV, and BHV-1 were detected according to the PCR conditions specified in the reference, using the primer sets in Table 1.

**Table 1.** Primer pairs using in PCR and RT-PCR step.

Viral agent	Primer	Region	Nucleotide sequence 5'→3'	PCR product	Reference
AKAV	AKAF1	S gene	TAACACGCATTGCAATGGC	709	Shin et al., 2009
	AKAR1		TAAGCTTAGATCTGGATACC		
	Nested F2		GAAGGCCAAGATGGTCTTAC	230	
	Nested R2		GGCATCACAATTGTGGCAGC		
BHV-1	gB1	gB	AAGCGCAAAAACGTGTG	323	Santurde et al., 1996
	gB2		TGCAGGTACAGCTTGGC		
Pan-pestivirus	P324	5'UTR	ATGCCCWTAGTAGGACTAGCA	288	Vilcek, 1994
	P326		TCAACTCCATGTGCCATGTAC		
BVDV-3	TF-3	N <sup>pro</sup>	ATGGAGTTGTTAAACTTTGAAC	494	Liu, 2009
	TR-3		GCAGCTTCTACCCAGATGG		
SBV	SBV-S-382F	S gene	TCAGATTGTCATGCCCTTGC		Tonbak et al., 2016
	SBV-S-469R		TCAGATTGTCATGCCCTTGC		
	SBV-S-408FAM		FAM-TTAAGGGATGCACCTGGGCCG ATGGT-		
			BHQ1		

PCR conditions for BHV-1 detection were performed as follows: 2 × concentrated PCR master mix solution (Hibrigen, Ist), 5 µL DNA template, 4 µL primer mix (forward and reverse primers), and PCR grade water in a 50 µL reaction. RT-PCR was performed in a 50-µL reaction volume containing reagents of the one-step RT-PCR (Qiagen, Germany) kit, 5 µL of DNA/RNA (50-100 ng/µL), probe and primer pairs (10 µM each), and water. Positive and negative controls in the Virology department of the Veterinary faculty of Firat University were used in each PCR step.

PCR amplicons obtained in the last step of the test were electrophoresed in agarose-TAE gel (40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA) containing ethidium bromide at 1.5% (w/v) concentration for 40 minutes at 120 volts. Precise identification of PCR products of the expected size was performed by sequence analysis.

**Sequence Analysis:** PCR products were purified from gels and sequenced by a commercial sequencing service (Macrogen Europe, The Netherlands). Sequencing was performed in an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems, MA, USA), using a Sanger dideoxy chain termination method and a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, MA, USA). Bi-directional nucleotide sequences aligned using the Clustal-W algorithm (Thompson et al., 1994). Edited sequences verified with Basic Local Alignment Search Tool (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) (BLASTn) were submitted to the GenBank database. A phylogenetic tree of the aligned multiple sequence data was performed using the Neighbor-joining method in 1000 replicates via the MEGA X program (Kumar et al., 2018).

## Results

According to PCR results, pestivirus was detected in 6 of 34 (17.6%) calves with abnormalities. After sequencing, the expected PCR product (288 nucleotides) for pestivirus showed high identity (97% and above) to the BVDV-1 strain/isolates in the GenBank.

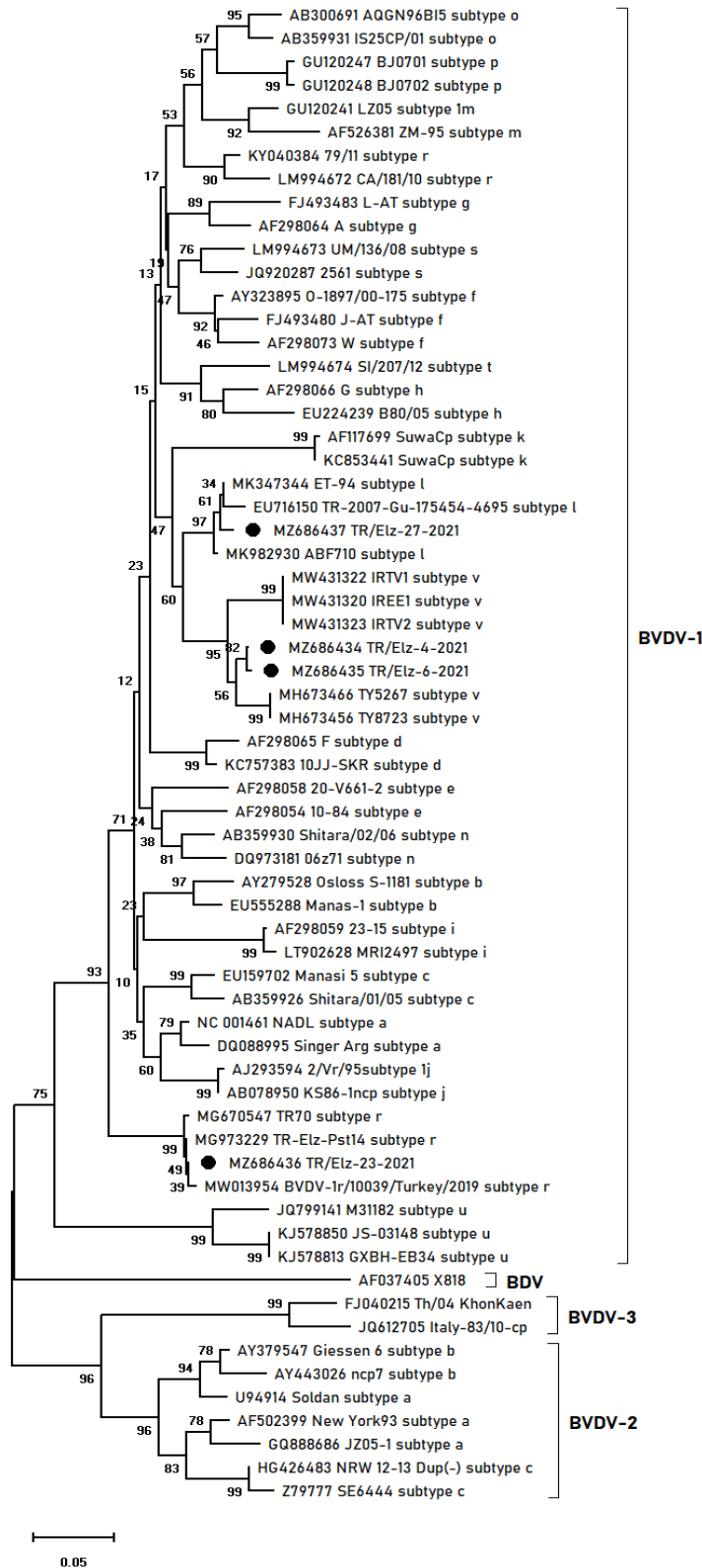
**Table 2.** Information on PCR-positive animals.

Sample No	Breed	Gender	Age (days)	Artificial insemination	Abnormality	Agent	Strain	Accession number
3	S	M	15	-	Hydrocephalus	BVDV-1l	-	
4	S	M	35	-	Brahignati inferior	BVDV-1l	TR/Elz-4-2021	MZ686434
5	S	F	7	-	Cheliognatopalotoschisis	BVDV-1r	TR/Elz-6-2021	MZ686435
14	S	M	3	+	Atresia ani	BVDV-1v	-	
23	S	M	4	+	Coccygeal agenesis	BVDV-1l	TR/Elz-23-2021	MZ686436
27	S	M	5	+	Brahignati inferior	BVDV-1v	TR/Elz-27-2021	MZ686437

S: Simmental breed; F: female; M: male.

As a result of the phylogenetic tree constructed with pestivirus nucleotide sequences from different subtypes from the same or different countries selected from Genbank,

one of them was -1r, two were -1v, and three were -1l subtypes. Four different from the sequence data were submitted to the GenBank database. AKAV, SBV, and BHV-1



**Figure 1.** Phylogenetic tree based on the nucleotide sequence of the 5'UTR regions of BVDV and BDV strains/isolates and constructed by the Neighbor-joining method (1000 replicates). Black circles represent different strains of BVDV-1 from this study.

were not found in calves with abnormalities. In each reaction, the positive controls produced the expected size of the PCR product while the negative controls did not. Two of 6 BVDV-1 positive calves had brachignati inferior one had

coccygeal agenesis, one had hydrocephalus, one had cheliognatopalotoschisis, and one had atresia ani. Information on PCR-positive animals is shown in Table 2. The nucleotide sequences of the BVDV-1 strains obtained in this

study were 86.00-100% identical to each other. These ratios were 75.00-99.00, 69.00-77.00%, 60.00-65.00%, and 66.00-70.00%, respectively, of some BVDV-1 BVDV-2, BVDV-3, and BDV strains/isolates selected in this study. Phylogenetic tree based on the nucleotide sequence of the 5'UTR regions of pestiviruses shown in Figure 1.

## Discussion

The exact cause of congenital abnormalities is not known, but it is stated that they may occur commonly due to genetic, environmental, or genetic-environment interactions at various stages of embryogenesis or fetal development (Gumusova, 2015; Gül and İssi, 2009; Gül et al., 2013; İssi et al., 2012; İssi et al., 2013; Maxie, 2015; Tamer and Okur Yildiz et al., 2022). Hereditary transmission of congenital abnormalities to the next generation causes worldwide concern. The use of artificial insemination, embryo transfer, and international trade in germplasm has led to the proliferation of economically important traits as well as some defective recessive genes with adverse effects on fertility and animal health (Windsor and Agerholm, 2009; Windsor et al., 2011). In this study, more than half of the calves with abnormalities (18/34, 53%) were born as a result of pregnancy after artificial insemination. This result may suggest the necessity of examining the hereditary characteristics of animals used in artificial insemination in more detail. These data should be supported by further studies. In this study, most of the abnormalities examined in calves were musculoskeletal anomalies (18/34, 53%). These results are in line with previous studies (Herschler et al., 1962; Ozaydin et al., 1995). Musculoskeletal abnormalities were followed by ocular/orbital (6/34) and the abdominal wall and gastrointestinal system (4/34) deformities. In other studies, gastrointestinal system abnormalities were the most common, followed by musculoskeletal abnormalities (Aksoy et al., 2006; Belge et al., 2000). Simmental breed and male gender were dominant in the calves examined in this study, and this result was in line with a previous report (Aksoy et al., 2006).

In this study, BVDV-1 was detected in 6 calves with abnormalities (6/34) and was mostly associated with musculoskeletal disorders (4/6) and less frequently with nervous (1/6) and abdominal wall/gastrointestinal system abnormalities (1/6). Pestivirus-positive calves had one of some abnormalities such as hydrocephalus, brahignati inferior (n:2), cheliognatopalotoschisis, atresia ani, and coccygeal agenesis. In previous studies (Gül et al., 2013; Gürçay et al., 2013; İssi et al., 2006; İssi et al., 2014; Ok 2010; Radostits et al., 2008), it has been reported that BVDV causes diarrhea, acute and chronic mucosal disease, immunotolerance, persistent infection, thrombocytopenic and hemorrhagic disease, reproductive failure, and congenital defects in cattle. Congenital disorders usually occur when developing in the period of immunocompetence. In calves due to BVDV infections are common microencephalopathy, porencephaly, hydranencephaly, hydrocephalus, cerebellar hypoplasia, and hypomyelination (Bielefeldt Ohmann, 1983). However, it is

stated that cataract, microphthalmia, retinal degeneration, optic neuritis, thymic hypoplasia, hypotrichosis and alopecia, curly hair coat, hyena disease, deterioration in osteogenesis, brachygnathia inferior and growth retardation may be other rare congenital defects (Radostits et al., 2008). Half of the 6 BVDV-1 strains examined in this study were of the -1l subtype and constituted the majority of the other detected subtypes (-1r, 1v), this finding is in line with previous studies (Oğuzoğlu et al., 2012; Timurkan and Aydın, 2019). To our knowledge, the -1v subtype has been previously identified in Türkiye and is reported for the first time in this study. These results indicate that the genetic diversity of BVDV-1 continues to increase. These results are important for control and eradication programs for BVDV.

AKAV causes infection in cattle, sheep and goats without any clinical signs. Intra-uterine infections in pregnant cattle cause abortion, premature and stillbirth as well as offspring with congenital abnormalities (Bowen, 2011). It affects varying degrees in the brain, spinal cord, and skeletal muscles and constitutes arthrogryposis and different vertebral malformations (torticollis, lordosis, kyphosis scoliosis). Pathological findings in the central nervous system range from encephalomyelitis, porencephaly, and hydranencephaly to microcephaly (Charles, 1994; Peperkamp et al., 2015; van den Brom et al., 2012). In cattle, AKAV infection in the first two months of pregnancy has almost no effect on the fetus (Radostits et al., 2008). AKAV causes hydranencephaly and porencephaly at days 76-104 of pregnancy, while it causes calves with and without vertebral deformities such as arthrogryposis, torticollis, scoliosis or kyphosis at days 105-170 of pregnancy. Malformations from infection in the last trimester of pregnancy are less severe. It is thought that SBV, which is in a similar serogroup with AKAV, also causes infections with similar characteristics (Charles 1994; Peperkamp et al., 2015, Tonvak et al., 2013). Although the calves examined in this study showed clinical features of arthrogryposis (n:1) and hydrocephalus (n:1) and the sampling was done during the high mosquito population, AKAV and SBV positivity could not be detected. The inclusion of calves with AH syndrome, an important feature of infections with these viruses, and a combination of both clinical features, could have increased the probability of detecting viruses.

BHV-1 is the causative agent of respiratory and genital tract infections such as infectious rhinotracheitis, infectious pustular vulvovaginitis, balanoposthitis, and abortion. Due to breeding synchronization in cattle, BHV-1 may also cause abortion storms (Ackermann, 2006). Although congenital abnormalities from BHV-1 have not been reported so far, they have been rarely associated with the central nervous disorder as well as stillbirth in calves. BHV-1 was not found in calves with congenital abnormalities in this study.

Although the primary purpose in cattle breeding seems to be high meat and milk yield, it is also very important to continue the production process with healthy newborn calves. For this reason, even if congenital anomalies are seen at a low rate in calves, they should not be underestimated as they will cause economic losses and we believe that clinician veterinarians should not ignore these diseases.



## Conflict of interest

The authors declared that there are no actual, potential, or perceived conflicts of interest for this article.

## Ethical permission

This study was performed with the permission of the Experimental Animals Local Ethics Committee in Firat University with 2020/05/09 dated 391732 approval number. In addition, the authors declared that they comply with the Research and Publication Ethics.

## Similarity Rate

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

## Author Contributions

Motivation/Concept: Mİ, SB

Design: Mİ, SB, HA

Control/Supervision: Mİ, ŞT, SB

Data Collection and/or Processing: SB, HA, KÇT, EP

Analysis and/or Interpretation: Mİ, HA, SB

Source Search: Mİ, SB, HA, KÇT, EP

Writing the Article: Mİ, SB, HA

Critical Review: Mİ, ŞT, SB

## References

- Ackermann M, Engels M, 2006: Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol*, 113 (3-4), 293-302.
- Agerholm JS, Hewicker-Trautwein M, Peperkamp K, Peter A, 2015: Windsor Virus-induced congenital malformations in cattle. *Acta Vet Scand*, 57 (1), 54.
- Aksoy F, 2001: Konjenital anomaliler: Tanımlama, sınıflama, terminoloji ve anomalili fetusun incelenmesi. *Türk Patoloji Dergisi*, 17, 57-62.
- Aksoy Ö, Kılıç E, Öztürk S, Özyayın İ, Kurt B, Baran V, 2006: Buzağı, kuzu ve oğlaklarda karşılaşılan doğumsal anomaliler: 1996-2005 (262 olgu). *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 12 (2), 147-154.
- Aslan ME, Azkur AK, Gazaygı S, 2015: Epidemiology and genetic characterization of BVDV, BHV-1, BHV-4, BHV-5 and Brucella spp. infections in cattle in Turkey. *J Vet Med Sci*, 77 (11), 1371-1377.
- Belge A, Gönenci R, Selçukbiricik H, Ormanci S, 2000: Buzağılarda doğumsal anomali olguları. *YYU Vet Fak Derg*, 11 (2), 23-26.
- Berber E, Sözdutalmaz İ, 2013: Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde koyunlarda görülen abort vakalarında pestivirusların rolünün araştırılması. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 27, 39-41.
- Bielefeldt Ohmann H, 1983: Pathogenesis of bovine virus diarrhoea mucosal disease: Distribution and significance of BVDV Antigen in diseased calves. *Res Vet Sci*, 34, 5-10.
- Bowen RA, 2011: Bunyaviridae. In: Fenner's Veterinary Virology, MacLachlan NJ, Dubovi EJ (Ed), 4th Editions, Elsevier Science Publishers, USA.
- Charles JA, 1994: Akabane virus. *Vet Clin N Am-Food A*, 10, 525-546.
- Doğan F, Bilge Dağalp S, 2017: Sığırlarda viral nedenli abort olgularının etiopatogenezi. *Mehmet Akif Ersoy Üniv Sag Bil Enst Derg*, 5 (1), 66-77.
- Fulton RW, Saliki JT, Confer AW, Burge LJ, d'Offay JM, Helman RG, Bolin SR, Ridpath JF, Payton ME, 2000: Bovine viral diarrhoea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: Clinical and necropsy samples from cattle. *J Vet Diagn Invest*, 12 (1), 33-38.
- Gül Y, İssi M, 2009: Oküler dermoidli buzağılarda serum A vitamini ve karoten düzeyleri. *YYU Vet Fak Derg*, 20 (1), 19-20.
- Gül Y, İssi M, Çevik A, Gürçay M, Baydar E, Erosuz H, 2013: Case report cerebellar hypoplasia associated with bovine viral diarrhoea BVD virus infection in a calf in Turkey. *Rev Med Vet*, 164 (10), 448-452.
- Gürçay M, İssi M, Gül Y, 2013: Investigation of bovine viral diarrhoea virus in dairy cattle premises where abortions occur. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 10 (2), 101-105.
- Herschler MS, Fechheimer NS, Gilmore LO, 1962: Congenital abnormalities in cattle: Their association with hereditary and environmental factors. *J Dairy Sci*, 45 (12), 1493-1499.
- İssi M, Gül Y, Baydar E, Gürçay M, Tümer KÇ, Parmaksız A, 2013: Kongenital ve anomalili bovin viral diyare virus enfeksiyonları. 10. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Kapadokya, Türkiye, pp. 143.
- İssi M, Gülaçtı İ, Kızıl Ö, Karapınar T, Bulut H, Gül Y, 2006. Kliniğimizde gözlemlenen ve RT PCR ile doğrulanan mucosal disease olguları. *FÜ Sağlık Bil Dergisi*, 20 (3), 253-258.
- İssi M, Gül Y, Gürçay M, Gök T, 2012: Elazığ yöresindeki koyunlarda saptanan pestivirus enfeksiyonu. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 26 (3), 165-169.
- İssi M, Gül Y, Özçelik M, Gürçay M, Baydar E, Çevik A, 2014: Bovin viral diyare virüs enfeksiyonlu bir buzağıda görülen buklemi kıl örtüsü. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 28 (1), 45-48.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, 2012: Family Flaviviridae. In: Virus Taxonomy, Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (Ed), 1003–1020, Academic Press, San Diego.
- King AMQ, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adams MJ, Dutilh BE, Gorbalenya AE, Harrach B, Harrison RL, Junglen S, Knowles NJ, Krupovic M, Kuhn JH, Lambert AJ, Łobocka M, Nibert ML, Oksanen HM, Orton RJ, Robertson DL, Rubino L, Sabanadzovic S, Peter Simmonds P, Smith DB, Suzuki N, Doerslaer KV, Vandamme AM, Varsani A, Zerbini FM, 2018: Changes to taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the international committee on taxonomy of viruses. *Archives Virol*, 163, 2601-2631.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018: MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*, 35, 1547-1549.
- Kurogi H, Inaba Y, Goto Y, Miura Y, Takahashi H, 1975. Serologic evidence for etiologic role of Akabane virus in epizootic abortion-arthrogryposis-hydranencephaly in cattle in Japan, 1972–1974. *Arch Virol*, 47 (1), 71-83.
- Lievaart-Peterson K, Luttikholt S, Peperkamp K, Van den Brom R, Vellema P, 2015. Schmallenberg disease in sheep or goats: Past, present and future. *Vet Microbiol*, 181 (1-2), 147-153.
- Liu L, Kampa J, Belák S, Baule C, 2009: Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04\_KhonKaen. *Vet Microbiol*, 138, 62-68.
- MacLachlan NJ, Dubovi EJ, 2016. Bunyaviridae. In: Fenner's Veterinary Virology, MacLachlan NJ, Dubovi EJ (Ed), 411-421, Elsevier Inc, San Diego, USA.
- MacLachlan NJ, Dubovi EJ, 2011: Flaviviridae. In: Fenner's Veterinary Virology, MacLachlan NJ, Dubovi EJ (Ed), 467-481, 4th Edition, Academic Press, London, UK.
- Maxie MG, 2015: Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, 6nd ed., Ontario.

- Metzler AE, Matile H, Gasmann U, Engels M, Wyler R, 1985. European isolates of bovine herpesvirus 1: A comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch Virol*, 85, 57-69.
- Miller JM, Whetstone CA, Van Der Maaten MJ, 1991. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res*, 52, 458-461.
- Mishra N, Rajukumar K, Pateriya A, Kumar M, Dubey P, Behera SP, Verma A, Bhardwaj P, Kulkarni DD, Vijaykrishna D, Reddy ND, 2014: Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet Microbiol*, 174 (1-2), 239-246.
- Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E, 2007: Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res*, 38, 181-209.
- Oğuzoğlu TC, Muz D, Yılmaz V, Timurkan MÖ, Alkan F, Akça Y, Burgu İ, 2012: Molecular characteristics of bovine virus diarrhoea virus 1 isolates from Turkey: Approaches for an eradication programme. *Transbound Emerg Dis*, 59(4), 303-310.
- Ok M, 2010: Bovine viral diyare mukozal hastalığı. In: Ruminantlarda Yaz Sorunları Beslenme ve Hastalıkları, Cebecioğlu A (Ed), 72-81, İnfvet, İstanbul.
- Ozaydin I, Kılıç E, Okumuş Z, Cihan M, 1995: 1992-1995 yılları arasında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Kliniği'ne getirilen buzağılardaki doğumsal anomali olguları. *Veteriner Cerrahi Dergisi*, 1 (2), 22-25.
- Peperkamp NH, Lutikholt SJ, Dijkman R, Vos JH, Junker K, Greijdanus S, Roumen MP, van Garderen E, Meertens N, van Maanen C, Lievaart K, van Wuyckhuise L, Wouda W, 2015: Ovine and bovine congenital abnormalities associated with intrauterine infection with Schmallenberg virus. *Vet Pathol*, 52, 1057-1066.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD, 2008: Veterinary Medicine. 10th ed., Saunders Elsevier, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto.
- Santurde G, Da Silva N, Villares R, E Tabares, Solana A, Bautista JM, Castro JM, 1996: Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Vet Microbiol*, 49, 81-92.
- Shin YK, Oem JK, Hyun BH, Tabares E, Solana A, Bautista JM, Castro JM, 2009: Monitoring of Five Bovine Arboviral Diseases Transmitted by Arthropod Vectors in Korea. *J Bacteriol Virol*, 39: 353-362.
- Spilki FR, Esteves PA, De Lima M, Franco AC, Chiminazzo C, Flores EF, Weiblen R, Driemeier D, Roehe PM, 2004: Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). *Pesq Vet Brasil*, 24, 43-49.
- Tamer C, Okur Gumusova S, 2017: Virüsler ve teratogenez. *Etilik Vet Mikrobiyol Derg*, 28: 115-122.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994: CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22 (22), 4673-4680.
- Timurkan MÖ, Aydın H, 2019: Increased genetic diversity of BVDV strains circulating in Eastern Anatolia, Turkey: First detection of BVDV-3 in Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 51 (7), 1953-1961.
- Tonbak S, Azkur A, Pestil Z, Bıyıklı E, Abaylı H, Baydar E, Poel W, Bulut H, 2016: Circulation of Schmallenberg virus in Turkey, 2013. *Turkish J Vet Anim Sci*, 40 (2), 175-180.
- van den Brom R, Lutikholt SJ, Lievaart-Peterson K, Peperkamp NH, Mars MH, van der Poel WH, Vellema P, 2012: Epizootic of ovine congenital malformations associated with Schmallenberg virus infection. *Tijdschr Diergeneesk*, 137, 106-111.
- Vandevelde M, Higgins RJ, Oevermann A, 2012: Veterinary Neuropathology. 1th ed, Oxford.
- Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ, 1994: Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol*, 136: 309-323.
- Windsor PA, Kessell AE, Finnie JW, 2011: Neurological diseases of ruminant livestock in Australia. V: Congenital neurogenetic disorders of cattle. *Aust Vet J*, 89 (10), 394-401.
- Windsor PA, Agerholm JS, 2009: Review inherited diseases of Australian Holstein-Friesian cattle. *Aust Vet J*, 87 (5), 193-199.
- Yildiz H, Safak T, Timurkaan N, Abaylı H, Cevik A, 2022: Border disease virusu ile enfekte bir kuzuda monosefaliyen sefalotorakopagus olgusu. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 36 (2), 140-144.
- Yurdakul I, Yalçın M, Karataş O, 2020: Bir buzağıda çoklu kongenital anomali olgusu. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 17 (3), 342-345.



## Yumurtacı Tavuklarda Tüy Kalitesi ve Göğüs kemiği Eğikliği ile Bazı Verim Özellikleri Üzerine Canlı Ağırlık ve Göğüs Kondisyonunun Etkisi

Gürkan ÖZKAN<sup>1,a</sup>, Metin PETEK<sup>1,b,\*</sup>

<sup>1</sup>Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-1379-1836

<sup>b</sup>ORCID: 0000-0003-4560-2438

Geliş Tarihi: 05.02.2023

Kabul Tarihi: 15.06.2023

Bu makale Nasıl kaynak gösterilir: Özkan G, Petek M. (2023). Yumurtacı Tavuklarda Tüy Kalitesi ve Göğüs kemiği Eğikliği ile Bazı Verim Özellikleri Üzerine Canlı Ağırlık ve Göğüs Kondisyonunun Etkisi. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 93-100, DOI:10.31196/huvfd.1247931.

\*Yazışma adresi: Metin PETEK

Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye.

e-mail: [petek@uludag.edu.tr](mailto:petek@uludag.edu.tr)

Online erişim adresi:

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Özet:** Bu çalışma yumurtacı tavuklarda tüy kalitesi ve göğüs kemiği eğikliği üzerine canlı ağırlık ve göğüs kondisyonunun etkisinin belirlenmesi amacıyla Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kanatlı Ünitesinde yetiştirilmekte olan 4000 adet Lohman LSL genotipi beyaz yumurtacı tavuk sürüsünden seçilen 450 adet tavuk üzerinde gerçekleştirilmiştir. Deneme başında tavuklar canlı ağırlıklarına göre; canlı ağırlığı 1100-1400 g arası olanlar hafif; 1400-1700 g arası olanlar orta; 1700-2000 g arası ağır grup olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Her ağırlık grubundaki hayvanlar göğüs genişliğine göre; göğüs genişliği 2,0-4,4 cm arası (dar) ve 4,5-6,0 cm arası (geniş) olmak üzere tekrar iki gruba ayrılmış, çalışmada 6 interaktif grup yer almıştır. Veri toplama işlemi 59 haftalık yaşta 67 haftalık yaşa kadar gerçekleştirilmiştir. Apartman tipi geleneksel kafes sisteminde; her kafes bölmesinde 5'er tavuk olacak olacak şekilde barındırılan tavuklar deneme süresince ticari yumurtacı tavuklar için standart koşullarda yetiştirilmiştir. Gruplarda; göğüs kemiği eğikliği; var/yok şeklinde tanımlanmış, tüy kalitesi; tüylerdeki hasar/kayıp durumuna göre; iyi (skor 0), orta (skor 1) ve zayıf (skor 2) şeklinde değerlendirilmiştir. Gruplarda günlük yumurta sayıları ve ölenler kaydedilmiş, deneme başı ve deneme sonunda her grupta ortalama yumurta ağırlığı belirlenmiştir. Çalışmada ortalama yumurtlama randımanı üzerine canlı ağırlığın etkisi önemli bulunmuştur (P<0,01). Göğüs kemiği eğikliği saptanan tavukların toplam içindeki payı deneme başı ve deneme sonunda değişmemiş, bütün gruplarda yaklaşık %50' nin üzerinde tespit edilmiştir. Genelde deneme başı toplam tüy kalitesi canlı ağırlıktan önemli düzeyde etkilenmiş (P<0,01), ancak deneme sonunda bu farklılık ortadan kalkmıştır. Sonuç olarak yumurtacı tavuklarda yaşla birlikte tüy kalitesinin kötüleştiği, ancak canlı ağırlık ve göğüs kondisyonunun göğüs kemiği eğikliği ve tüy kalitesi üzerine önemli bir etki göstermediği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Canlı ağırlık, Göğüs kemiği hasarları, Göğüs kondisyonu, Tüy kalitesi, Yumurtacı tavuk.

### Effects of live body weight and breast condition on plumage quality and keel bone deviation in laying hens

**Abstract:** This study was carried out on 450 hens selected from a flock of 4000 Lohmann LSL genotype white layers reared in Bursa Uludag University, Faculty of Veterinary Medicine, in the Poultry Unit to determine the effects of body weight and breast condition on plumage quality and keel bone deviation in laying hens. At the beginning of the experiment, the birds were divided into three groups according to the live weight of chickens ; those with a live weight of 1100-1400g were light; the ones between 1400-1700 g as the medium group, and between 1700-2000g as the heavy group. According to the breast width of the animals in each weight group, the birds were further divided into two groups 2.0-4.4 cm (narrow) and 4.5-6.0 cm (wide). Thus, six interactive groups were included in the study. Data collection was carried out from 59 weeks to 67 weeks of age. The hens with five chickens in each cage compartment were housed in the apartment-type traditional cage system and raised under standard conditions for commercial layers during the experiment. In the groups; keel bone deviation was defined as yes/no; and plumage quality was evaluated as good (score 0), moderate (score 1), and poor (score 2) according to their plumage loss. The daily number of eggs and deaths in the groups were recorded, and the average egg weight in each group was determined at the beginning and end of the experiment. In the study, the effect of live weight on the mean laying performance was significant (P<0.01). The proportion of hens with a keel bone deviation at the experiment's beginning and end was over 50% in all groups. The initial total feather quality of the birds was significantly affected by live weight (P<0.01). As a result, it was determined that feather quality deteriorated with age in laying hens. However body weight and breast condition did not affect the birds' keel bone deviation and plumage quality.

**Keywords:** Breast condition, Keel bone deviation, Laying hen, Live body weight, Plumage quality.

## Giriş

Yumurtacı tavuklarda tüy çekme ve kanibalizm ile göğüs kemiği hasarları iki önemli hayvan refahı problemi olup, kafessiz barındırma sistemlerinin yaygınlaşması ile görülme sıklığı daha da artmıştır (Coton ve ark., 2019; Jung ve ark., 2019; Kaukonen ve Valros, 2019; Petek ve Çavuşoğlu, 2021; Rieke ve ark., 2020). İngiltere’de 119 adet serbest dolaşimli free range yumurtacı işletmeyi kapsayan bir çalışmada kloakal gagalama oranının %19,5-29,9 arasında değiştiği, kanibalizm görülme oranının ise; %22,6 olduğunu bildirmiştir (Lampton ve ark., 2015). Her ikisi de acı ve ağrı verici olan bu iki hayvan refahı problemi aynı zamanda yumurta verimi, yem tüketimi ve yemden yararlanmayı da olumsuz etkilemektedir. Göğüs kemiği eğiklikleri ileri düzeyde uygun olmayan kümes içi ekipmanlar, yetersiz besleme gibi faktörlerin etkisi ile göğüs kemiğinde kırılma ve çatlamalara da yol açabilmektedir (Rufaner ve ark., 2020). Elli haftadan daha ileri yaşlı tavuklarda yumurta verimindeki düşme göğüs kemiği hasarlarının etkisi ile daha da belirginleşmektedir (Rufaner ve ark., 2019).

Tavuklarda göğüs kemiği eğiklikleri, kırık ve çatlakları ile tüy çekme ve kanibalizmin tek bir nedeni olmayıp, barınak içi çevresel faktörler, genotip, canlı ağırlık ve besleme gibi çok değişik nedenlerden kaynaklanmaktadır (Jung ve ark., 2019; Mens ve ark., 2020; Petek ve Çavuşoğlu, 2021; Sibanda ve ark., 2020). Zenginleştirilmiş kafesler, derin altlık ve ızgara-altlık sistemlerinde kullanılan tünek, folluk, katlı ızgara gibi ekipmanların yoğunluğuna bağlı olarak tavuklarda göğüs

kemiği hasarları o kadar fazla ortaya çıkmaktadır (Habig ve ark., 2021; Riber ve ark., 2018; Rufaner ve ark., 2020). Hardin ve ark. (2019) barındırma sistemi ve barınak içi düzenlemeler, genetik yapı ve yaşa bağlı olarak göğüs kemiği hasar düzeyinin değiştiğini ve farklı barınak sistemleri arası karşılaştırma yapmayı zorlaştırdığını bildirmişlerdir. Sözcü ve ark. (2021) serbest dolaşimli free-range sistemde yetiştirilen Atak-S tavuklarda diğer yerli tavuklara göre daha yüksek oranda tüylerde ve göğüs kemiğinde hasar oluştuğunu bildirmişlerdir. Garant ve ark. (2022) kahverengilere göre beyaz tüylü tavukların tüy kaybına karşı daha duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Sibanda ve ark. (2020) farklı ağırlık grubundaki serbest dolaşimli free-range yumurtacı tavuklardan canlı ağırlığı en düşük (hafif) tavuklarda göğüs bölgesinde tüy kalitesi skorunun en kötü olduğunu tespit etmişlerdir. Petek ve ark. (2022) geleneksel kafes sisteminde yetiştirilen beyaz yumurtacı tavuklarda göğüs kondisyonu, göğüs kemiğinde eğilme ve yumurta verimi arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Kafessiz sistemler ile karşılaştırıldığında geleneksel kafes sistemi ile zengin ve zenginleştirilebilir kafes sistemlerinde yetiştirilen yumurtacı tavuklarda tüy çekme ve kanibalizm ile göğüs kemiği hasarları konusunda yeterince araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışma, geleneksel kafes sisteminde yetiştirilen beyaz yumurtacı bir tavuk sürüsünde tüy kalitesi ve göğüs kemiği eğikliği üzerine canlı ağırlık ve göğüs kondisyonunun etkisini incelemek amacı ile yapılmıştır.

**Tablo 1.** Gruplarda yer alan kafes/bölme sayıları, deneme başı toplam hayvan sayıları ortalama göğüs genişliği ve ortalama canlı ağırlıklar ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ).

Gruplar	Kafes/Bölme Sayısı	Hayvan sayısı	Göğüs genişliği**, cm	Canlı ağırlık***, g
<b>Canlı Ağırlık</b>				
Hafif	27	135	4,48±0.001 <sup>c</sup>	1322±0.22 <sup>c</sup>
Orta	36	180	4,59±0.001 <sup>b</sup>	1547±0.16 <sup>b</sup>
Ağır	27	135	4,72±0.002 <sup>a</sup>	1795±0.19 <sup>a</sup>
<b>Göğüs Kondisyonu</b>				
Dar	45	225	4,28±0.001	1546±0.15
Geniş	45	225	4,91±0.002	1563±0.16
<b>Canlı AğırlıkxGöğüs Kondisyonu</b>				
HafifxDar	18	90	4,20±0.001	1322±0.25
OrtaxDar	18	90	4,28±0.002	1526±0.23
AğırxDar	9	45*	4,36±0.001	1789±0.31
HafifxGeniş	9	45*	4,76±0.002	1322±0.36
OrtaxGeniş	18	90	4,89±0.001	1567±0.23
AğırxGeniş	18	90	5,08±0.001	1800±0.22
<b>ANOVA</b>			<b>P değeri</b>	
Canlı Ağırlık			0,001	0,001
Göğüs Kondisyonu			0,001	Ö.D
Canlı AğırlıkxGöğüs Kondisyonu			0,001	Ö.D

\*Yeterli hayvan bulunamadığından hayvan sayısı sınırlı kalmıştır, \*\* Göğüs kondisyonu; dar; 2,0-4,4 cm, geniş; 4,5-6,0 cm, \*\*\*Canlı ağırlık; hafif; 1100-1400 g, orta; 1400-1700 g, ağır; 1700-2000 g.

## Materyal ve Metot

Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Sağlığı ve Hayvansal Üretim Araştırma ve

Uygulama Merkezi Tavukçuluk ünitesinde yetiştirilmekte olan 4000 adet Lohman LSL genotipi beyaz yumurtacı tavuk sürüsünden seçilen toplamda 450 beyaz yumurtacı tavuk üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hayvan Deneyleri Etik Kurulları

Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik, Madde 8; 19-k uygun olarak veriler toplanmıştır (Resmi Gazete, 2014). Deneme başında ana sürüde bulunan hayvanlar bireysel tartılarak canlı ağırlıklarına göre, hafif, orta ve ağır olmak üzere 3 ayrı gruba ayrılmıştır. Hafif grupta canlı ağırlığı 1100-1400 g arası olan tavuklar, orta ağır grupta canlı ağırlığı 1400-1700 g arası olanlar ve ağır grupta canlı ağırlığı 1700-2000 g arası olan tavuklar yer almıştır. Her ağırlık grubundaki hayvanların göğüs genişlikleri pergel ile ölçülerek tekrar iki ayrı gruba ayrılmıştır. Göğüs genişliği 2,0-4,4 cm arası olan tavuklar dar göğüs kondisyonlu, 4,5-6,0 cm arası olanlar geniş göğüs kondisyonlu grupta yer almıştır. Bu şekilde çalışmada 2 göğüs genişliği x 3 ağırlık grubu olmak üzere 6 interaktif grup oluşturulmuştur (Tablo 1).

Çalışmada yer alan tavuklar pencereless bir kümesteki üç katlı apartman sistemi geleneksel kafeslerde barındırılmış, yumurtacı tavuklar için standart bakım ve besleme koşullarında yetiştirilmişlerdir (Anonim, 2020). Çalışmada yer alan her bir kafes bölmesi 50 cm genişlik x 50 cm derinlikte olup, araştırma süresince gün ışığına ilave suni ışık olmak üzere günde 16 saat aydınlatma uygulanmış, ad libitum olarak ikinci dönem kafes yumurta tavuk yemleri ile besleme yapılmıştır. Deneme grupları oluşturulduktan sonra iki haftalık bir adaptasyon dönemi uygulanmış, veri toplama işlemi 59 haftalık yaştan 67 haftalık yaşa kadar devam etmiştir. Deneme gruplarında canlı ağırlıklar bireysel tartım ile ölçülmüş, her grupta rastgele toplanan 30 adet günlük yumurta bireysel tartılarak ortalama yumurta ağırlıkları belirlenmiş, yumurta verimleri günlük kaydedilmiştir. Deneme başı ve deneme sonunda gruplarda tespit edilen yumurta sayıları deneme başında gruplarda yer alan tavuk sayılarına oranlanarak tavuk-kümes olarak deneme başı ve deneme sonu ortalama yumurta verimleri hesaplanmıştır. Günlük yumurta sayıları o gün yaşayan tavuk sayısına bölünmüş (tavuk-gün) ve deneme süresi ortalama yumurta verimi hesaplanmıştır (North ve Bell, 1990). Deneme başı ve deneme sonu her gruptan 30 adet yumurta bireysel olarak 0,01 grama hassas terazide tartılarak ortalama yumurta ağırlıkları belirlenmiştir. Deneme başı ve deneme sonunda gruplarda yer alan yumurtacı tavuklarda tüy kalitesi bireysel olarak dört vücut bölgesinde (baş-boyun, sırt, butlar-kloaka ve göğüs-karın bölgesi); Grafl ve ark. (2017) tarafından bildirilen skorlama yöntemine göre doğrudan gözlem yolu ile ölçülmüştür. Skor 0; hasarsız veya çok az hasarlı mükemmel tüy kalitesi ve iyi tüylü vücut bölümünü; skor 1; çap veya uzunluğu 5 cm' den küçük olan tüysüz bir noktayı (*hafif hasarlı tüyler*), skor 2 ise; çapı/genişlik veya uzunluğu 5 cm' den büyük olan tüysüz bir noktayı (*şiddetli hasarlı tüyler*), bir veya birden fazla büyük tüysüz alanları ifade etmek için kullanılmıştır. Dört vücut bölgesinden ölçülen tüy kalitesi skorları, minimum 0 (*mükemmel*) ve maksimum 8 (*zayıf*) olmak üzere dört bölgenin toplamı; toplam tüy kalitesi puanını oluşturmuştur. Gruplarda yer alan tavukların göğüs kemiğinde ortaya çıkan eğiklikler doğrudan gözlem yolu ile; anatomik bir düzlemde (180°'lik açıda); göğüs kemiğinde düz çizgiden sapma olup olmamasına göre, göğüs kemiği eğikliği var/yok şeklinde değerlendirilmiştir (Casey-Trott ve ark., 2015; Casey-Trott ve ark., 2017). Çalışmada incelenen verilerden canlı ağırlık, göğüs genişliği, yumurta verimi,

yumurta ağırlığı, toplam ve ortalama tüy kalite skoru bakımından gruplar arası karşılaştırmalar için çok yönlü varyans analizi kullanılmış, gruplar arası farklılıkların önemli bulunması halinde Tukey testi yapılmıştır (Snedecor ve Cochran, 1994). Yumurta verimi ve ölüm oranı için veriler önce arcsin dönüşüme tabi tutulmuştur (Ahrens ve ark. 1990; Çelik ve Erar 2013). Aynı gruptaki deneme başı ve deneme sonu toplam ve ortalama tüy skoru; t testi (Paired Sample t-test) ile karşılaştırılmış, göğüs kemiği eğikliğinin yaygınlık düzeyi ve ölüm oranı bakımından karşılaştırmalar khi-kare testi ile yapılmıştır. İstatistiki testler SPSS bilgisayar programında yapılmıştır (Spss Inc 2018).

## Bulgular

Bu çalışmada oluşturulan deneme gruplarında deneme başı ve deneme sonu ortalama canlı ağırlık ve göğüs genişliği değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Hafif, orta ve ağır gruplardaki hayvanların deneme başı ortalama canlı ağırlıkları arası farklılıklar önemli bulunurken ( $P<0.001$ ), dar ve geniş göğüslü hayvanların deneme başı canlı ağırlıkları arası farklılıklar önemsiz bulunmuştur. Farklı ağırlık gruplarının ve farklı göğüs kondisyonuna sahip tavukların göğüs genişlikleri arası farklılıklar ile göğüs genişliği bakımından canlı ağırlık x göğüs kondisyonu arası etkileşimler önemli bulunmuştur ( $P<0.001$ ,  $P<0.001$ ).

Deneme gruplarında deneme başı ve deneme sonu yumurtlama randımanları ile araştırma dönemi süresince hesaplanan ortalama yumurtlama randımanları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Hafif, orta ve ağır canlı ağırlık gruplarında deneme başı yumurtlama randımanı sırası ile %84,40, 87,20 ve 85,00, deneme sonu yumurtlama randımanı sırası ile %61,10, 71,10 ve 68,90 bulunmuş, ortalama yumurtlama randımanı ise sırası ile; %80,10, 84,30 ve 83,50 hesaplanmıştır. Ortalama yumurtlama randımanı üzerine canlı ağırlığın etkisi ( $P<0,01$ ), deneme başı yumurtlama randımanı üzerine göğüs kondisyonunun etkisi ( $P<0,05$ ) ile deneme sonu yumurtlama randımanı bakımından canlı ağırlık ile göğüs kondisyonu arası etkileşim önemli bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Deneme gruplarında canlı ağırlığı hafif, orta ve ağır grupta deneme başı ortalama yumurta ağırlıkları sırası ile; 62,55, 61,73 ve 63,14 g, deneme sonu yumurta ağırlıkları ise sırası ile 63,25, 63,24 ve 63,59 g bulunmuştur (Tablo 3). Dar ve geniş göğüs kondisyonuna sahip hayvanlarda ise; yumurta ağırlığı deneme başında 63,32 ve 61,63 g, deneme sonunda 63,77 ve 62,96 g tespit edilmiştir. Deneme başı yumurta ağırlığı yumurtacı tavukların göğüs kondisyonundan önemli düzeyde etkilenmiştir ( $P<0,05$ ). Deneme sonu yumurta ağırlığı üzerine ise hem canlı ağırlık, hem de göğüs kondisyonunun etkisi önemsiz bulunmuştur. Yumurta ağırlığı bakımından canlı ağırlık x göğüs kondisyonu arası etkileşimler önemsiz bulunmuştur. Deneme gruplarında en yüksek ölüm oranı %4 ile orta canlı ağırlıkta ve dar göğüs kondisyonu sahip tavuklarda tespit edilmiş, ölüm oranı bakımından gruplar arası farklılıklar önemsiz bulunmuştur (Tablo 3).

Deneme gruplarında yer alan tavuklarda deneme başı ve deneme sonu tespit edilen göğüs kemiği eğikliklerinin gruplardaki yaygınlık düzeyi Tablo 4' de gösterilmiştir. Hafif

**Tablo 2.** Gruplarda hesaplanan deneme başı ve deneme sonu ile ortalama yumurtlama randımanları (%).

Gruplar	Yumurtlama randımanı		
	Deneme Başı	Deneme Sonu	Ortalama
<b>Canlı Ağırlık**</b>			
Hafif	84,40±3.81	61,10±3.21	80,10 <sup>a</sup> ±3.22
Orta	87,20±3.81	71,10±3.33	84,30 <sup>b</sup> ±3.40
Ağır	85,00±3.90	68,90±3.34	83,50 <sup>b</sup> ±3.15
<b>Göğüs Kondisyonu*</b>			
Dar	81,50±3.31	67,00±3.45	82,30±3.22
Geniş	89,60±3.20	67,00±3.47	82,90±3.50
<b>Canlı AğırlıkxGöğüs Kondisyonu</b>			
HafifxDar	82,20±4.66	68,90±5.02	80,32±4.33
OrtaxDar	80,00±4.99	63,30±4.99	83,68±4.22
AğırxDar	82,20±4.67	68,90±4.49	82,92±4.33
HafifxGeniş	86,70±4.08	53,30±4.25	79,88±4.25
OrtaxGeniş	94,40±4.98	78,90±4.16	84,88±4.33
AğırxGeniş	87,80±4.96	68,90±4.21	84,04±4.98
<b>ANOVA</b>		<b>P değeri</b>	
Canlı Ağırlık	Ö.D	Ö.D	0,01
Göğüs Kondisyonu	0,05	Ö.D	Ö.D
Canlı AğırlıkxGöğüs Kondisyonu	Ö.D	0,05	Ö.D

\*Göğüs genişliği; dar; 2,0-4,4 cm, geniş; 4,5-6,0 cm, \*\*Canlı ağırlık; hafif;1100-1400 g, orta; 1400-1700 g, ağır; 1700-2000 g.

**Tablo 3.** Deneme gruplarında ölüm oranı (%) ve yumurta ağırlıkları ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ).

Gruplar	Ölüm Oranı %	Yumurta Ağırlığı, g	
		Deneme Başı	Deneme Sonu
<b>Canlı Ağırlık**</b>			
Hafif	2,50	62,55±0.73	63,25±0.66
Orta	3,00	61,73±0.65	63,24±0.60
Ağır	2,50	63,14±0.73	63,59±0.68
<b>Göğüs Kondisyonu*</b>			
Dar	3,00	63,32±0.58	63,77±0.53
Geniş	2,34	61,63±0.57	62,96±0.53
<b>Canlı AğırlıkxGöğüs Kondisyonu</b>			
HafifxDar	3,00	63,07±0.92	63,44±0.86
OrtaxDar	4,00	62,21±0.91	63,52±0.85
AğırxDar	2,00	64,70±1.13	64,34±1.05
HafifxGeniş	2,00	62,03±1.12	63,07±1.05
OrtaxGeniş	2,00	61,25±0.92	62,97±0.86
AğırxGeniş	3,00	61,59±0.91	62,85±0.85
<b>ANOVA</b>		<b>P değeri</b>	
Canlı Ağırlık	Ö.D	Ö.D	Ö.D
Göğüs Kondisyonu	Ö.D	0,05	Ö.D
Canlı AğırlıkxGöğüs Kondisyonu	Ö.D	Ö.D	Ö.D

\*Göğüs genişliği; dar; 2,0-4,4 cm, geniş; 4,5-6,0 cm, \*\*Canlı ağırlık; hafif;1100-1400 g, orta; 1400-1700 g, ağır; 1700-2000 g

ve orta canlı ağırlık grubunda göğüs kemiği eğikliği tespit edilen hayvanların oranı deneme başında %60 iken, ağır grupta %57,77 bulunmuş, hafif, orta ve ağır grupta deneme sonu göğüs kemiğinde eğiklik tespit edilen hayvanların oranı sırası ile; %60,00, 56,66 ve 51,11 hesaplanmıştır. Deneme gruplarının kendi içinde deneme başı ve deneme sonu göğüs kemiği eğikliği bakımından farklılıklar bütün gruplarda önemsiz bulunmuştur.

Hafif, orta ve ağır gruplarda deneme başı toplam tüy skoru sırası ile; 2,15, 3,12 ve 2,95, deneme sonu toplam tüy skoru sırası ile; 4,27, 4,35 ve 4,40 bulunmuştur (Tablo 5). Deneme başı ve deneme sonu toplam tüy skoru; dar göğüslü hayvanlarda 2,83 ve 4,51, geniş göğüslü hayvanlarda 2,64 ve 4,17 hesaplanmıştır. Üç farklı ağırlık grubunda deneme başı ortalama tüy skoru sırası ile 0,54, 0,78 ve 0,74, deneme sonu ortalama tüy skoru sırası ile; 1,07, 1,09 ve 1,10

**Tablo 4.** Deneme gruplarında deneme başı ve deneme sonu göğüs kemiği eğikliği saptanan tavukların yüzde dağılımı.

Gruplar	Deneme Başı	Deneme Sonu	P
<b>Canlı Ağırlık**</b>			
Hafif	60,00	60,00	1,000
Orta	60,00	56,66	0,711
Ağır	57,70	51,11	0,525
<b>Göğüs Kondisyonu*</b>			
Dar	56,00	49,33	0,326
Geniş	61,33	62,66	0,866
<b>Canlı AğırlıkxGöğüs Kondisyonu</b>			
HafifxDar	53,33	50,00	0,796
OrtaxDar	66,00	50,00	0,190
AğırxDar	46,00	46,00	1,000
HafifxGeniş	73,33	80,00	0,666
OrtaxGeniş	53,33	63,33	0,432
AğırxGeniş	63,33	53,33	0,432
<b>P</b>			
Canlı Ağırlık	Ö.D	Ö.D	
Göğüs Kondisyonu	Ö.D	Ö.D	
Canlı AğırlıkxGöğüs Kondisyonu	Ö.D	Ö.D	

\*Göğüs genişliği; dar; 2,0-4,4 cm, geniş; 4,5-6,0 cm, \*\*Canlı ağırlık; hafif;1100-1400 g, orta; 1400-1700 g, ağır; 1700-2000 g.

hesaplanmıştır. Deneme başı toplam ve ortalama tüy skoru canlı ağırlıktan önemli düzeyde etkilenmiş ( $P<0,01$ ), deneme başı ve deneme sonu canlı ağırlık x göğüs kondisyonu arası etkileşimler ise önemsiz bulunmuştur. Gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde; orta x dar grup hariç diğer bütün

interaktif gruplarda deneme başına göre deneme sonu toplam ve ortalama tüy kalitesi skoru önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $P<0,001$ ,  $P<0,05$ ,  $P<0,05$ ,  $P<0,01$ ,  $P<0,05$ ).

**Tablo 5.** Gruplarda deneme başı ve deneme sonu toplam ve ortalama tüy skorları ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ).

Gruplar	Toplam Tüy Skoru			Ortalama Tüy skoru*		
	Deneme Başı	Deneme Sonu	P	Deneme Başı	Deneme Sonu	P
<b>Canlı Ağırlık***</b>						
Hafif	2,15±0.25 <sup>b</sup>	4,27±0.35	0.001	0,54±0.062 <sup>b</sup>	1,07±0.08	0.001
Orta	3,12±0.20 <sup>a</sup>	4,35±0.29	0.001	0,78±0.051 <sup>a</sup>	1,09±0.07	0.001
Ağır	2,95±0.25 <sup>a</sup>	4,40±0.35	0.002	0,74±0.062 <sup>a</sup>	1,10±0.09	0.002
<b>Göğüs Kondisyonu**</b>						
Dar	2,83±0.19	4,51±0.27	0.001	0,71±0.05	1,13±0.07	0.001
Geniş	2,64±0.19	4,17±0.26	0.001	0,66±0.04	1,04±0.07	0.001
<b>CanlıAğırlıkxGöğüsKondisyonu</b>						
HafifxDar	1,90±0.29	4,20±0.40	0.001	0,48±0.072	1,05±0.10	0.001
OrtaxDar	3,47±0.28	4,33±0.40	0.084	0,87±0.071	1,08±0.10	0.084
AğırxDar	3,13±0.41	5,00±0.57	0.019	0,78±0.102	1,25±0.14	0.019
HafifxGeniş	2,40±0.40	4,33±0.57	0.023	0,60±0.102	1,08±0.14	0.023
OrtaxGeniş	2,77±0.28	4,37±0.40	0.002	0,68±0.072	1,09±0.10	0.002
AğırxGeniş	2,76±0.29	3,80±0.41	0.042	0,69±0.071	0,95±0.10	0.042
<b>ANOVA</b>						
Canlı Ağırlık	0,01	Ö.D		0,01	Ö.D	
GöğüsKondisyonu	Ö.D	Ö.D		Ö.D	Ö.D	
CanlıAğırlık*GöğüsKondisyonu	Ö.D	Ö.D		Ö.D	Ö.D	

\*Skor 0; iyi, skor 1 (hafif/orta tüy hasarı/kaybı), skor 2 (şiddetli tüy hasarı/kaybı), \*\*Göğüs genişliği; dar; 2,0-4,4 cm, geniş; 4,5-6,0 cm, \*\*\*Canlı ağırlık; hafif;1100-1400 g, orta; 1400-1700 g, ağır; 1700-2000 g.

## Tartışma

Yumurtacı tavuklarda en önemli refah ve sağlık problemlerinden olan tüy çekme ve kanibalizm ile göğüs kemiği hasarlarının genotip, barındırma, barınak içi düzenlemeler gibi yönetsel faktörlerden önemli düzeyde etkilendiği (Norman ve ark., 2021; Petek 2020), yumurta verimi ile tüy kalitesi (Yamak ve Sarıca, 2021) ve göğüs kemiği hasarları (Rufaner ve ark., 2019) arasında önemli bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Geleneksel apartman tipi kafeste yetiştirilen beyaz yumurtacı tavuklarda gerçekleştirilen bu çalışmada ortalama yumurta verimi üzerine canlı ağırlığın etkisi önemli bulunurken ( $P<0,01$ ), göğüs kondisyonunun etkisi önemsiz bulunmuştur. Canlı ağırlık arttıkça genelde ortalama yumurta verimi de artmış, ağırlığı düşük olan (hafif) tavukların ortalama yumurtlama randımanı orta ve ağır gruptan önemli düzeyde daha düşük bulunmuştur. Bütün gruplarda deneme başına göre deneme sonunda yaşla birlikte yumurta verimi düşmüştür. Bu çalışmada tespit edilen deneme başı ve deneme sonu tavuk-kümes yumurtlama randımanı standart değerlere göre daha düşük bulunmuştur (Anonim, 2020). Yumurtacı tavuklarda yumurta verimi başta genetik yapı, aydınlatma, besleme ve barındırma koşulları olmak üzere çok sayıda faktörün etkisi altındadır. Deneme sonu yumurtlama randımanı bakımından canlı ağırlık ile göğüs kondisyonu arası etkileşim önemli bulunmuştur. Dar göğüs kondisyonlu gruplar arasında deneme sonu yumurtlama randımanı bakımından farklılıklar önemsiz iken, geniş göğüs kondisyonlu hayvanlarda canlı ağırlık deneme sonu yumurtlama randımanı üzerine önemli bir etki oluşturmuştur. Bu çalışmada deneme başı ortalama yumurta ağırlığı üzerine göğüs kondisyonunun etkisi önemli bulunurken ( $P<0,05$ ), deneme sonu ortalama yumurta ağırlığı üzerine hem canlı ağırlık hem de göğüs kondisyonunun etkisi önemsiz bulunmuştur. Yumurtacı tavuklarda yumurta ağırlığı üzerine besleme ve genotip başta olmak üzere canlı ağırlık, barındırma koşulları, kuluçka koşulları ve kuluçka stresi gibi çok sayıda faktör etkili olup, tavuk yaşı ile birlikte yumurta ağırlığı artmaktadır (Anonim, 2020; Anene ve ark., 2020; Hedlund ve Jensen, 2022). Yüksek ölüm oranı; yetersiz hayvan sağlığı ve refahının en önemli göstergelerinden birisidir. Bu çalışmada gruplarda tespit edilen ölüm oranı en fazla %4 olup, genelde Pereira ve ark. (2010) tarafından bildirilen yumurtacı tavuklar için kabul edilebilir ölüm oranına yakın bulunmuştur. Bu çalışmada canlı ağırlık ve göğüs kondisyonunun ölüm oranı üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur.

Tavuk yaşı, çevresel etkiler, besleme, genetik yapı, barındırma sistemi gibi çok sayıda hazırlayıcı faktörün etkisi ile tavuklarda göğüs kemiği hasarlarının görülme düzeyi sürüden sürüye değişebilmektedir (Dedousi ve ark., 2020, Rufaner ve ark., 2020, Rufaner ve Makagon 2020, Thofner ve ark., 2021). Bu çalışmada deneme başında ve deneme sonunda göğüs kemiğinde eğilme saptanan tavukların toplam içindeki payı bütün gruplarda %50'nin üzerinde ve birbirine yakın düzeyde bulunmuştur. Deneme başı ve deneme sonu göğüs kemiği eğikliğinin yaygınlık düzeyi bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Wall ve ark. (2022) zenginleştirilmiş

kafeslerde yetiştirilen Lohmann LSL genotipi yumurtacı tavuklarda geleneksel derin altlık üzerinde yetiştirilenlere göre; göğüs kemiği eğiklik düzeyinin daha düşük olduğunu; her iki barındırma sisteminde de yaşla birlikte göğüs kemiği eğiklik düzeyinin daha da şiddetli hale geldiğini bildirmişlerdir. Petek ve Çavuşoğlu (2021) iki değişik serbest dolaşimli free-range sistemde yetiştirilen tavuklarda göğüs kemiği eğiklik düzeyinin %37,5 ile %75,0 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Kemik direnci üzerine genetik yapı da etkili bir faktör olup, Chew ve ark. (2021) aydınlatma yoğunluğunun Lohman kahverengi ve beyaz yumurtacı tavuklarda göğüs kemiği hasarları üzerine etkisi olmadığını, beyaz yumurtacıların önemli düzeyde daha dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Thofner ve ark. (2021) Danimarka'da yumurtacı tavuk sürülerinde göğüs kemiği hasarlarını inceledikleri bir çalışmada göğüs kemiği eğikliklerinin bütün yetiştirme sistemlerinde yaygın bir şekilde görüldüğünü, yumurta verimi başlangıç yaşı ve yumurta verimi başlangıcındaki ortalama yumurta ağırlığının göğüs kemiği hasarları üzerine önemli bir etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Edgar ve ark. (2023) göğüs kemiği kırık ve çatlaklarının yumurtacı tavuklarda canlı ağırlık ve yumurta kabuk membranı dışında verim özellikleri üzerine önemli bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Tavuklarda göğüs kemiği kırıklarının nedeni tam olarak bilinmese de kafes ya da diğer barındırma sistemlerinde ekipmanlara çarpma, özellikle kalabalık gruplarda ve alaca karanlık loş bir ortamda tüneklere doğru sıçrama esnasında tüneklere çarpma sonucu göğüs kemiğinde kırık ve çatlaklar oluşabilmektedir.

Bu çalışmada deneme başı toplam tüy kalitesi canlı ağırlıktan önemli düzeyde etkilenirken, deneme sonu toplam tüy kalitesi üzerine canlı ağırlık ve göğüs kondisyonunun etkisi önemsiz bulunmuştur. Bütün gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında; deneme başına göre deneme sonunda toplam tüy skoru; orta ağırlıkta x dar göğüslü grup hariç, önemli düzeyde yükselmiş, gruplarda yer alan tavuklarda tüy kalitesi kötüleşmiştir. Genel bir değerlendirme yapıldığında deneme sonu tüy kalitesinin orta düzeyde ya da ortanın biraz üzeri olduğu söylenebilir. Katlı kafes sisteminde barındırma farklı katlarda bulunan hayvanlarda tüy kalitesi farklı olabilmektedir (Fidan ve Nazlıgöl, 2013; Tok ve ark., 2022). Bu çalışmada gruplarda yer alan tavuklar apartman sistemi geleneksel batarya tip kafeste; her katta her gruptan hayvan olacak şekilde homojen olarak dağıtıldığından ve gruplarda yer alan tavukların hepsinin de gagası kesilmiş ve gagaların genel durumu benzer durumda olduğundan tavuklarda tüy kalitesinde görülen farklılıkların farklı kafes katlarından ve farklı gaga yapısından etkilenmediği düşünülmektedir. Barındırma sistemi tavuklarda tüy çekme davranışını etkileyen en önemli faktörlerdendir. Wall ve ark. (2022) geleneksel derin altlık üzerinde yetiştirilen Lohman ve Bovans beyaz yumurtacı hibritlerden; Lohman LSL genotipinin tüy kalitesinin daha iyi olduğunu, ancak zenginleştirilmiş kafeslerde Lohman LSL hibrit genotipte tüy kalitesinin daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Petek ve ark. (2015) serbest dolaşimli free-range yumurtacı tavuklarda yaptıkları bir çalışmada toplam tüy kalitesinin yaş ile birlikte kötüleştiğini ve gezinti otlama alanına mümkün olduğu kadar tavukların erken bir yaşta çıkarılması durumunda tüy



kalitesinin daha iyi olduğunu bildirmişlerdir. Dikmen ve ark. (2016) değişik barındırma sistemlerinin etkilerini karşılaştırdıkları bir çalışmada en iyi tüy skoruna sahip hayvanların serbest dolaşimli free-range sistemde yetiştirilen tavuklar olduğunu bildirmişlerdir. Değişik ülkelerde ticari koşullarda yapılan çok sayıda çalışmada tüy çekme davranışının kafessiz yetiştirme sistemlerine %40-80 arasında yaygın olduğu ve kanibalizm görülme düzeyinin %40'a kadar yüksek olabildiği bildirilmiştir (Estevinho, 2021).

## Sonuç

Bu çalışmada geleneksel apartman tipi kafes sisteminde yetiştirilen beyaz yumurtacı tavuklarda canlı ağırlık ve göğüs kondisyonunun göğüs kemiği eğikliği ve tüy kalitesi üzerine önemli bir etki göstermediği, ortalama yumurtlama randımanının canlı ağırlıktan etkilendiği, bütün gruplarda deneme başına göre deneme sonu tüy kalitesinin kötüleştiği tespit edilmiştir.

## Açıklama

Bu çalışma "Geleneksel kafes sisteminde yetiştirilen beyaz yumurtacı bir tavukta hayvan refahı üzerine canlı ağırlık, yaş ve göğüs kondisyonunun etkisi" konu başlıklı Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir. Tez çalışmasından özetlenen "Live body weight, breast condition and welfare outcomes of a white laying hen housed in conventional cages" konu başlıklı poster bildiri "Recent Advances in Animal Welfare Science VIII - Virtual UFAW Animal Welfare Conference, 29th-30th June 2021" isimli toplantıda sunulmuş ve konferans kitapçığında yayımlanmıştır.

## Teşekkür

Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Sağlığı ve Hayvansal Üretim Araştırma ve Uygulama Merkezi Tavukçuluk ünitesinde gerçekleştirilmiş olup, Veteriner Fakültesi Dekanlığı ve Tavukçuluk Ünitesi çalışanlarına teşekkür ederiz.

## Çıkar Çatışması Beyanı

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

## Etik İzin

Hayvan Deneyleri Etik Kurulları Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik, Madde 8; 19-k gereği bu çalışma için etik kurul iznine gerek yoktur (Resmi Gazete, 2014).

## Benzerlik Oranı

Makalenin benzerlik oranının sisteme yüklenen raporda belirtildiği gibi %9 olduğunu beyan ederiz.

## Yazar Katkıları

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

## Kaynaklar

- Ahrens W, Cox D, & Budhwar G, 1990: Use of the Arcsine and Square Root Transformations for Subjectively Determined Percentage Data. *Weed Science*, 38 (4-5), 452-458. doi:10.1017/S0043174500056824.
- Anene DO, Akter Y, Thomson PC, Groves P, O'Shea CJ, 2020: Variation and Association of Hen Performance and Egg Quality Traits in Individual Early-Laying ISA Brown Hens. *Animals*, 10, 1601.
- Anonim, 2020: Lohmann LSL Classic Layers Management Guide-Cage Housing. Lohman Breeders. Lohmann Breeders GmbH. [https://lohmannbreeders.com/files/downloads/MG/Cage/LB\\_MG\\_Cage\\_LSL-Classic\\_EN.pdf](https://lohmannbreeders.com/files/downloads/MG/Cage/LB_MG_Cage_LSL-Classic_EN.pdf) (Son okuma 24.10.2022).
- Casey-Trott TM, Guerin MT, Sandilands V, Torrey S, Widowski TM, 2017: Rearing system affects prevalence of keel-bone damage in laying hens: a longitudinal study of four consecutive flocks. *Poult Sci*, 96, 2029-2039.
- Casey-Trott T, Heerkens JLT, Petrik M, Regmi P, Schrader L, Toscano MJ, Widowski T, 2015: Methods for assessment of keel bone damage in poultry. *Poult Sci*, 94, 2339-2350.
- Chew J, Widowski T, Herwig E, Shynkaruk T, Schwean-Lardner K, 2021: The effect of light intensity on the body weight, keel bone quality, tibia bone strength, and mortality of brown and white feathered egg-strain pullets reared in perchery systems. *Poult Sci*, 100, 101464.
- Coton J, Guinebretière M, Guesdon V, Chiron G, Mindus C, Laravoire A, Pauthier G, Balaine L, Descamps M, Bignon L, Huneau-Salaün A, Michel V, 2019: Feather pecking in laying hens housed in free-range or furnished-cage systems on French farms. *Br Poult Sci*, 60, 617-627.
- Çelik R, Erar A, 2013: Değişken Dönüşümlerinin Kelebek Dağılan Artıklar için Değişen Varyanslılığa Etkileri. *AKU FemUBİD* 13, 1-10.
- Dedousi A, Stojčić MĐ, Sossidou E, 2020: Effects of housing systems on keel bone damage and egg quality of laying hens. *Vet Res Forum*, 11, 299.
- Dikmen BY, Ipek A, Şahan Ü, Petek M, Sözcü A, 2016: Egg production and welfare of laying hens kept in different housing systems (conventional, enriched cage, and free range). *Poult Sci*, 95, 1564-1572.
- Edgar JL, Omi Y, Booth F, Mackie N, Richards G, Tarlton J, 2023: Fear, anxiety, and production in laying hens with healed keel bone fractures. *Poult Sci*, 102 doi: 10.1016/j.psj.2023.102514.
- Estevinho J, 2021: Welfare implications of cage-free egg production. *Poult World* <https://www.poultryworld.net/health-nutrition/welfare-implications-of-cage-free-egg-production/> (Güncelleme; 25.03.2022, son okuma; 19.10.2022).
- Derele Fidan E, Nazlıgül A, 2013: Cage position and density effect on some welfare criteria in Denizli chicken. *Indian J Anim Sci*, 83 (6), 645-648.

- Garant R, Tobalske BW, Sassi NB, van Staaveren N, Widowski T, Powers DR, Harlander-Matauschek A, 2022: Wing-feather loss in white-feathered laying hens decreases pectoralis thickness but does not increase risk of keel bone fracture. *R Soc Open Sci*, 9, 220155.
- Grafl B, Polster S, Sulejmanovic T, Pürner B, Guggenberger B, Hess M, 2017: Assessment of health and welfare of Austrian laying hens at slaughter demonstrates influence of husbandry system and season. *Br Poult Sci*, 58, 209-215.
- Habig C, Henning M, Baulain U, Jansen S, Scholz AM, Weigend S, 2021: Keel Bone Damage in Laying Hens-Its Relation to Bone Mineral Density, Body Growth Rate and Laying Performance. *Animals (Basel)*, 11, 1546.
- Hardin E, Castro FLS, Kim WK, 2019: Keel bone injury in laying hens: the prevalence of injuries in relation to different housing systems, implications, and potential solutions. *World's Poult Sci J*, 75, 285-292.
- Hedlund L, Jensen P, 2022: Effects of stress during commercial hatching on growth, egg production and feather pecking in laying hens. *PLoS ONE* 17(1): e0262307.
- Jung L, Niebuhr K, Hinrichsen LK, Gunnarsson S, Brenninkmeyer C, Bestman M, Knierim U, 2019: Possible risk factors for keel bone damage in organic laying hens. *Anim*, 13 (10), 2356-2364.
- Kaukonen E, Valros A, 2019: Feather Pecking and Cannibalism in Non-Beak-Trimmed Laying Hen Flocks-Farmers' Perspectives. *Animals (Basel)*, 9 (2), 43.
- Lampton SL, Knowles TG, Yorke C, Nicol CJ, 2015: The risk factors affecting the development of vent pecking and cannibalism in free-range and organic laying hens. *Anim Welf*, 24 (1), 101-111.
- Mens AJW, Van Krimpen MM, Kwakkel RP, 2020: Nutritional approaches to reduce or prevent feather pecking in laying hens: any potential to intervene during rearing? *World's Poult Sci J*, 76, 591-610
- Norman KI, Weeks CA, Tarlton JF, Nicol CJ, 2021: Rearing experience with ramps improves specific learning and behaviour and welfare on a commercial laying farm. *Sci Reports* 11, 8860
- North BB, Bell DD, 1990: Commercial Chicken Production Manual, USA.
- Pereira DF, Vale MM, Zevolli BR, Salgado DD, 2010: Estimating mortality in laying hens as the environmental temperature increases. *Rev Bras Ciencia Avi*, 12, 265-271.
- Petek M, Topal E, Cavusoglu E, 2015: Effects of age at first access to range area on pecking behaviour and plumage quality of free-range layer chickens. *Arch Anim Breed*, 58 (1), 85-91.
- Petek M, 2021: Effects of Housing Locations on Feather Damages of Laying Hens in a Free-Range Housing System. *J Hellenic Vet Med Soc*, 71 (4), 2525-2530.
- Petek M, Abdourhamane IM, Brav FC, Ünal C, 2022: Effects of keel bone deviation on post-peak egg production in a commercial laying hen flock with different breast condition. *J Res Vet Med*, 41 (2), 74-79.
- Petek M, Çavuşoğlu E, 2021: Welfare Assessment of Two Free-range Laying Hen Flocks in Turkey. *J App Anim Welf Sci*, 24 (1), 56-63.
- Resmî Gazete, 2014: Hayvan deneyleri Yerel Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, sayı: 28914.
- Riber AB, Casey-Trott TM, Herskin MS, 2018: The Influence of Keel Bone Damage on Welfare of Laying Hens. *Front Vet Sci*, 5, 6.
- Rieke L, Spindler B, Zylka I, Kemper N, Giersberg MF, 2021: Pecking Behavior in Conventional Layer Hybrids and Dual-Purpose Hens Throughout the Laying Period. *Front Vet Sci*, 8, 660400.
- Rufener C, Baur S, Stratmann A, Toscano MJ, 2019: Keel bone fractures affect egg laying performance but not egg quality in laying hens housed in a commercial aviary system. *Poult Sci*, 98, 1589-1600.
- Rufener C, Rentsch AK, Stratmann A, Toscano MJ, 2020: Perch Positioning Affects both Laying Hen Locomotion and Forces Experienced at the Keel. *Animals*, 10, 1223.
- Rufener C, Makagon MM, 2020: Keel bone fractures in laying hens: a systematic review of prevalence across age, housing systems, and strains. *J Anim Sci*, 98(Supplement\_1), S36-S51.
- Sibanda TZ, Kolakshyapati M, Walkden-Brown SW, De Souza Vilela J, Courtice JM, Ruhnke I, 2020: Body weight sub-populations are associated with significant different welfare, health and egg production status in Australian commercial free-range laying hens in an aviary system. *Europ Poult Sci*, 84.
- Snedecor GW, Cochran WG, 1994: Statistical methods (eighth edition). Calcutta, India: Oxford & IBH Publishing Co.
- Sözcü A, İpek A, Oğuz Z, Gunnarsson S, Riber AB, 2021: Comparison of Behavioral Time Budget and Welfare Indicators in Two Local Laying Hen Genotypes (Atak-S and Atabey) in a Free-Range System. *Animals*, 12, 46.
- SPSS Statistics. 2018: IBM SPSS Statistics 22 Documentation, IBM Corporation, Somers, New York, USA.
- Thøfner IC, Dahl J, Christensen JP, 2021: Keel bone fractures in Danish laying hens: Prevalence and risk factors. *PLoS One*, 16 (8), e0256105.
- Tok S, Şekeroğlu A, Duman M, Tainika B, 2022: Effect of age, stocking density, genotype, and cage tier on feather score of layer pure lines. *Turk J Vet Anim Sci*, 46, 115-123
- Wall H, Boyner M, De Koning, DJ, Kindmark A, Mc Cormack HA, Fleming R H, Tauson R, 2022: Integument, mortality, and skeletal strength in extended production cycles for laying hens—effects of genotype and dietary zinc source. *Br Poult Sci*, 63 (2), 115-124.
- Yamak US, Sarıca M, 2012: Relationships between feather score and egg production and feed consumption of different layer hybrids kept in conventional cages. *Arc Geflügeld*, 76, 31-37.



## Köpek Salya Örneklerinden *Pasteurella multocida* Varlığının PCR ve Kültürel Yöntemlerle Araştırılması

Serdal TARHANE<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Laborant Veteriner Sağlık Programı, Veterinerlik Bölümü, Çankırı, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID:0000-0003-0806-7659

Geliş Tarihi: 05.02.2023

Kabul Tarihi: 14.06.2023

**Bu makale Nasıl kaynak gösterilir:** Tarhane S. (2023). Köpek Salya Örneklerinden *Pasteurella multocida* Varlığının PCR ve Kültürel Yöntemlerle Araştırılması. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 101-106, DOI:10.31196/huvfd.1247860.

**\*Yazışma adresi:** Serdal TARHANE

Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Laborant Veteriner Sağlık Programı, Veterinerlik Bölümü, Çankırı, Türkiye.

e-mail: serdaltarhane@karatekin.edu.tr

Online erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Özet:** *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) gram negatif kokobasil görünümlü bir bakteri olup hem insan hem de çeşitli hayvanlarda sistemik ve sistemik olmayan birçok hastalığın müsebbibi zoonotik bir bakteridir. Dünya genelinde pet hayvanı olarak kedi ve köpek yetiştiriciliği gittikçe artmaktadır. Gelişmemiş ya da gelişmekte olan ülkelerde başıboş köpek sayısının gittikçe artmasıyla insan ve diğer hayvanların başıboş ya da sahipli köpeklerin ısırıklarına sıklıkla maruz kaldığı belirtilmektedir. *P. multocida*'nın köpeklerin oral boşluğundan sıklıkla izole ve identifiye edildiği birçok makalede ortaya konulmuş, köpek ve kedilerin *P. multocida* enfeksiyonları için büyük bir risk teşkil ettiği belirtilmiştir. Bu çalışmada *P. multocida*'nın köpek salyasında varlığını araştırmak amacı ile Çankırı hayvan barınağında tutulan 44 köpekten salya örneği alındı. Köpek salyalarının 12'sinden (%27, 27) *P. multocida* kültür ve PCR ile tespit edildi. Tespit edilen *P. multocida* suşlarının disk difüzyon test sonucunda, tamamının (%100) amoksisiline ve cephalotine dirençli olduğu, tamamının (%100) cephoperazona duyarlı, %75'inin ise streptomycine dirençli olduğu gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik direnç, Köpek, *P. multocida*, Salya.

### Investigation for the Presence of *Pasteurella multocida* in Dog Saliva Samples by PCR and Cultural Methods

**Abstract:** *P. multocida* is a gram-negative coccobacillus bacterium and a zoonotic bacterium responsible for many systemic and non-systemic diseases in humans animals. Cat and dog breeding as pet animals is increasing worldwide, and it is stated that humans and other animals are frequently exposed to the bites of stray or owned dogs, with an increasing number of stray dogs in underdeveloped or developing countries. It has been stated in many articles that *P. multocida* is frequently isolated and identified from the oral cavity of dogs, and it has been stated that dogs and cats pose a significant risk for *P. multocida* infections. In this study, saliva samples were taken from 44 dogs kept in the Çankırı animal shelter to investigate the presence of *P. multocida* in dog saliva. *P. multocida* from 12 (27, 27%) of dog saliva was detected by culture and PCR. It was observed that all (100%) of the identified *P. multocida* strains were resistant to amoxicillin and cephalotin in the disk diffusion test result, all (100%) were susceptible to cephoperazone, and 75% were resistant to streptomycin.

**Keywords:** Antibiotic resistance, Dog, *P. multocida*, Saliva.

## Giriş

İnsanlık yaklaşık 12000 yıl önce, hayvan ve bitkileri evcilleştirerek yeni bir deneyim kazanmış, evcilleştirdikleri hayvan ve bitkileri kendi yararları için kullanmışlardır. Günümüzde arkeolojik bulgular köpeklerin evcilleştirilmesinin insanlık tarihi kadar eski olduğunu göstermektedir (Morey, 1994). Hayvanların evcilleştirilmesi zoonotik mikropların insanları infekte etmesini de beraberinde getirmiştir. Yapılan birçok çalışmada zoonotik hastalıkların çoğunun özellikle memeli hayvanlardan kaynaklandığı ortaya konulmuştur (Albery ve Becker, 2020).

Günümüzde köpek yetiştiriciliği halen popülaritesini korumakta, köpek sahiplerinin Amerika Birleşik Devleti (ABD)'de %49'unun, Avusturalya'da %39'unun, İngiltere'de %26'sinin, bu hayvanlara evlerinde baktıkları rapor edilmiştir (Holland, 2019). Buna karşın Avrupa Birliği (AB) ülkeleri ve ABD'de sokak hayvanı sorununun olmadığı, ancak ülkemizde özellikle sokak hayvanı olarak köpek sayısının giderek arttığı belirtilmektedir (Kırışık ve Öztürk, 2021). Sahipli ya da sahihsiz köpeklerin kendini güvensiz hissettiğinde, yemek rekabeti veya alanını koruma gibi içgüdüsel sebeplerden dolayı insan ve diğer hayvanlara saldırdıkları bilinmektedir (Atalay, 2004; Aydoğdu ve Meral, 2019).

Kedi ve özellikle köpekler tarafından insan ve hayvan yaralanmalarının en önemlilerinin ısırık yaralanmaları olduğu; köpeklerin agresifliğinin ırk, yaş ve cinsiyetine bağlı olarak değişkenlik gösterebildiği belirtilmektedir (Kılıç ve Sarierler, 2003).

Kedi ve köpekler insanların uzun zamandan beri çevrelerini paylaştıkları hayvanlar olup halen insanların bakteriyel, viral, fungal ve paraziter birçok enfeksiyon etkeninin kaynağı olarak varlıklarını sürdürmektedirler (Chomel, 2014).

*P. multocida* gram negatif kokobasil görünümü, kedi ve köpeklerin orofaringeal sekresyonlarından sıklıkla izole edilen (Korkmaz ve ark., 2021) ve özellikle hayvan ısırıklarından sonra insanlarda en çok rastlanılan zoonotik bir bakteri olarak tanımlanmaktadır (Giordano ve ark., 2015). Yaşlı ve bağışıklığı baskılanmış kişilerde *P. multocida* yumuşak doku hastalıklarına yol açabilmektedir. Tavuk ve hindilerde sistemik hastalığa neden olmayan *P. multocida* suşlarının subkutan olarak enjekte edildiğinde kolayca gelişerek tavuklarda granülomlara, hindilerde ise deride kabuklanmalara sebebiyet verdiği belirtilmektedir (Wilkie ve ark., 2012). Bu hastalıkların yanında kanatlılarda kolera (Mbuthia ve ark., 2008), bufalo, deve, geyik, nadiren atlarda, domuz ve buzağılarda hemorajik septisemi, domuz ve tavşanlarda atropik rinitis, buzağı, koyun ve domuzlarda enzootik pnömoni ve pasteurellozis hastalıklarına sebebiyet verebildiği bilinmektedir (Wilkie ve ark., 2012). Bu hastalıkların yanında insanlarda ısırık ve cerrahi enfeksiyonları, meningitis, pulmoner pnömoni, epiglottitis, gastrointestinal ve intra-abdominal glossitis, kardiyovasküler hastalıklar, kadınlarda genital sistem hastalıkları vb. gibi birçok hastalıkla da ilişkilendirilmektedir (Kannagara ve ark., 2020).

*P. multocida* karada ve suda yaşayan birçok omurgalı hayvanın orofaringeal ve gastrointestinal florasında herhangi

bir hastalığa sebebiyet vermeden bulunabilmektedir. *P. multocida*'nın sağlıklı hayvanların üst solunum yollarında hayatta kalabildiği ve bu hayvanların *P. multocida*'nın yayılmasında ana kaynak olarak rol aldığı üzerinde durulmakta; bu bakterinin organik maddelerde uzun süre, suda ise bir yıla kadar yaşayabildiği gösterilmiştir (Magyar ve Lax, 2014).

*P. multocida*'nın kedi ve köpeklerin salyasından (Rollof ve ark., 1989; Tınmaz ve ark., 2021); kanguru, keseli sıçan gibi hayvanların da oral boşluğundan sıklıkla izole edildiği buna karşılık fare ve ratlardaki sıklığının daha az olduğu belirtilmektedir (Wilson ve Ho, 2013). Evcil ve yabani birçok hayvanın üst solunum yollarında herhangi bir enfeksiyona yol açmadan bulunabilen *P. multocida*'ya %50 ile 90 arasında en çok kedilerin salyasında rastlandığı ve kedilerden sonra ikinci sırada köpeklerin salyasında %20 ile %50 oranında bulunabildiği belirtilmektedir (Hasan ve Hug, 2022).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018'deki raporuna göre, köpek ısırıkları insidansına global olarak bir tahminin olmadığı; ancak yapılan araştırmalar sonucu yıllık on milyonlarca insan yaralanmasının köpek ısırıkları tarafından gerçekleştiği üzerine durulmaktadır. Buna mukabil olarak ABD'de yıllık 4,5 milyon insanın köpekler tarafından ısırıldığı, bu ısırıklarda %3 ile %18 arasında enfeksiyon geliştiği ve bu enfeksiyonlar sonucu %10 ile 20 arasında ölüm meydana geldiği belirtilmektedir (WHO, 2018).

Pet hayvanı olarak köpek yetiştiriciliğinin ve gelişmekte olan ülkelerde başıboş köpek sayısının artması ile insan ve diğer hayvanların, köpeklerin ısırıklarına sıklıkla maruz kalabildiği birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Yapılan bu çalışmada Çankırı İl'i hayvan barınağında bulunan köpeklerin salya örneklerinden *P. multocida*'nın varlığı kültürel ve moleküler yöntemlerle araştırılması ve antimikrobiyel direnç özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Etik izin:** Bu çalışma 15 Şubat 2014 tarih ve 2814 sayılı Resmî gazetede yayınlanan Orman ve Su İşleri Bakanlığının "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 8. K bendi, 5. Fırkasına göre elde edilen örnekler sürüntü örneği olduğu için HADYEK iznine tabi değildir.

Yapılan bu çalışmanın materyallerini Çankırı hayvan barınağında tutulan köpeklerin salyası oluşturmuştur. Bu amaç ile Çankırı hayvan barınağında tutulan toplam 44 köpekten, steril svab kullanılarak salya örnekleri alındı ve içerisinde 0,5 ml fizyolojik tuzlu su bulunan steril vida kapaklı cam tüplere aktarıldı. Örnekler daha sonra çalışılmak üzere Çankırı Karatekin Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı'nda -80 °C'de saklandı.

**Kültür:** Hayvanlardan alınan oral sıvab örnekleri vorteksenerek homojenize edildikten sonra, 2 µg/mL clindamycin içeren, %5 koyun kanlı agara inoküle edilerek 37 °C'de aerobik ortamda 24 saat inkübe edildi. Katı besiyerinde üreme gösteren tüm örnekler oksidaz ve katalaz testlerine

tabi tutuldu. Oksidaz ve katalaz pozitif olarak test edilen bakteriler Gram boyamadan sonra, ışık mikroskopunda incelenerek Gram negatif, çubuk ya da kokobasil görümlü bakteri kolonileri, DNA ekstraksiyonu için 100 µL fizyolojik tuzlu su içeren tüplere aktarıldı (Santaniello ve ark., 2020). Tüm izolatların DNA ekstraksiyonları, kloroform izoamil alkol yöntemi ile gerçekleştirildi (Oklander ve ark., 2004).

**PCR:** Katalaz, oksidaz ve Gram boyama sonucu *Pasteurella spp.* şüpheli kolonilerden elde edilen DNA ekstraksiyonları, PCR metodu ile tür düzeyinde tanımlanmaya çalışıldı. Bunun için dış membran proteinini kodlayan, gen bölgesini hedef alan primerler kullanıldı (Tablo 1. PCR reaksiyonu için 14,5 µL DNA-RNA free su, 2 µL primerler (F ve R), 5 µL PCR buffer, 0,5 µL dNTP, 0,5 taq polimeراز enzimi ve 2,5 µL DNA olmak üzere, toplam reaksiyon hacmi 25 µL olacak şekilde ayarlandı. PCR koşulları toplam 40 döngü olacak şekilde: denaturasyon 95 °C 1dakika, primerlerin bağlanması 57 °C 15 saniye. ve zincirin uzaması 72 °C 10 dakika. olarak ayarlandı ve ürünler termal cycler cihazına yüklenerek amplifiye edildi (Krol ve ark., 2011).

**Tablo 1.** Kullanılan primerler ve baz dizilimleri.

Primer adı	<i>P. multocida</i> tür spesifik primerler	Bant büyüklüğü (bp)
KMTJB-F	3'-TGCCACTTGAATGGGAAATG-5'	168
KMTJB-R	3'-AATAACGTCCAATCAGTTGCC-5'	Krol ve ark., 2011

Oluşan amplifiye ürünler etidium bromid ile boyanarak %1,5'lük agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutularak ultraviyole ışığı altında görüntülendi ve dökümente edildi. 168 bp'ye tekabül eden bantlar *P. multocida* olarak değerlendirildi.

**Antibiyotik duyarlılık testi:** Kültür, oksidaz, katalaz ve PCR testleri ile *P. multocida* olduğu belirlenen koloniler, fizyolojik tuzlu su içeren cam tüplerde süspansiyon edilerek oluşan bulanıklık Mac Farland 0,5 standardına göre ayarlandı. Her bir tüpten 1 ml alınarak %5 koyun kanı içeren Mueller-Hinton Agar besiyerine iyice yayıldıktan sonra; amoxicillin 25 µg (Aml 25), streptomycin 10 µg (S10), cephalotin 30 µg (Cf 30) ve cephoperazone 75 µg (Cfp 75) (Oxoid) antibiyotiklerini içeren diskler Mueller-Hinton besi yerine aktararak 36 °C'de 18 saat inkübe edildi. Disklerin etrafında oluşan zon cetvelle ölçüldü (Gürbüz ve Şahin, 2003; Tel ve Keskin, 2010). Meydana gelen inhibisyon zonları Clinical and Laboratory Standards Institute'ın (CLSI 2013) belirlediği standartlara göre dirençli (R), duyarlı (S), orta düzeyde duyarlı (I) olarak değerlendirildi.

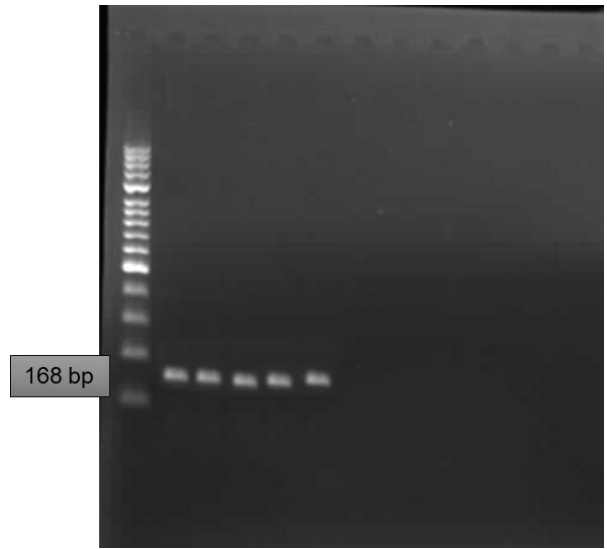
## Bulgular

**Kültür:** Çankırı hayvan barınağında tutulan 39 dişi ve 5 erkek (toplam 44) yetişkin köpekten alınan salya örneklerinin, klindamisin içeren selektif besi yerine ekimi sonucu toplam 13 örnekte (%30) koloni gelişimi gözlemlendi. Besi yerinde koloni gelişimi gösteren 13 örneğin 1'inde oksidaz ve katalaz testi negatif olarak gözlemlendi (Şekil 1).



**Şekil 1.** A: *Pasteurella spp.* koloni morfolojisi, B: Katalaz testi, C: Oksidaz testi, D: Mikroskopik görüntü.

**PCR:** Amplifiye edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucu ultraviyole ışığında görüntülenmesi ile 12 adet 168 bp'ye denk gelen bant gözlemlendi ve *P. multocida* olarak değerlendirildi (Şekil 2).



**Şekil 2.** Amplifiye ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.

**Antibiyotik duyarlılık testi:** Kültür, biyokimyasal testler ve PCR sonucu *P. multocida* olduğu belirlenen 12 suşun antibiyotik duyarlılık test sonucu Tablo 2. de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** *P. multocida* disk diffüzyon antibiyotik duyarlılık testi.

Antibiyotik	S			I			R		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Aml 25µg	0 (%0)	0 (%0)	12 (%100)						
Cfp 75µg	11 (%92)	0 (%0)	1 (%8)						
Cf 30 µg	0 (%0)	0 (%0)	12 (%100)						
S 10 µg	3 (%25)	0 (%0)	9 (%75)						

Antibiyotik duyarlılık test sonucu tüm suşlar (%100) amoxicillin 25 µg ve cephalotin 30 µg'e dirençli olduğu gözlemlendi. Cephoperazone 75 µg'e karşı ise *P. multocida*

suşlarının %92'sinin duyarlı olduğu gözlemlendi. Streptomycin 10 µg'e karşı suşların %75'inin dirençli olduğu gözlemlenirken, orta düzeyde duyarlı hiçbir suş (%0) gözlemlenmedi.

## Tartışma ve Sonuç

*P. multocida* hayvan ısırıklarına maruz kalan insanlarda sıklıkla tanımlanan zoonotik enfeksiyöz bir bakteri olarak tanımlanmaktadır (Giordano ve ark., 2015). Roloff ve ark. (1989) tarafından konvansiyonel metodlarla yapılan bir çalışmada pet hayvanı olarak 21 köpeğin 17'sinde (%81) *P. multocida* izole ve identifiye edildiğini bildirmişlerdir. Santaniello ve ark.'nın (2020) terapi amaçlı köpek eğitim merkezinde köpek salyaları örneklerinde kültürel ve PCR metodlar kullanarak yaptıkları bir çalışmada, 200 köpeğin 25'inde (%12,5) *P. multocida* izole ve identifiye edildiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada 44 köpeğin 12'sinde (%27,27) *P. multocida* tanımlanmış olup, bu sonuç Giordano ve ark. (2015) ile Santaniello ve ark.'nın (2020) bulduğu sonuçlardan farklılık göstermektedir. Bu farklılığın Santaniello ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada belirtildiği gibi yaş cinsiyet, coğrafya ve hayvanın yaşadığı yerlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

*P. multocida*'nın çeşitli hayvan tırmık ya da ısırıklardan sonra oluşan yaralanmalar sonucu en sık olarak yumuşak doku enfeksiyonlarına yol açabildiği belirtilmektedir. Gündüz ve ark. (2011) tarafından Eskişehir'de son 5 yıllık hastane kayıtları baz alarak yapılan bir çalışmada, hastalardan 116'sının köpek ve 46'sının kedi ısırığıyla hastaneye başvurduğu ve bu ısırık mağdurlarının çoğunun çocuk olduğu rapor edilmiştir. Özsoy ve ark. (2002) tarafından Refik Saydam Hıfzısıhha, Merkezi Kuduz Aşı İstasyonu'na gelen hastalarda yapılan çalışmada, 2000 yılında 1530 kişinin hayvan ısırığıyla bu istasyona başvurduğunu, ısırık vakalarının %68'inin köpek kaynaklı olduğu belirtilmiş ve her yıl ülkemizde 82000 kişinin hayvan ısırığı ile karşılaştığı üzerine vurgu yapılmıştır. Bu çalışmada köpek salyalarının %27,27'sinde *P. multocida* izole edilmiş olup; bu sonuç köpek ısırıkları sonucu *P. multocida*'nın bulaşma potansiyelinin oldukça yüksek olabileceği görüşünü desteklemektedir (Hasan ve Hug, 2022).

*P. multocida*'nın en yaygın bulaş yolu ısırık ve tırmalama olarak belirlenmesine rağmen, nadiren de olsa solunum veya hayvanların yalaması sonucu da bulaşabileceği, aynı zamanda meningitis, bakteriyemi ve endokardit gibi hastalıklara da yol açabildiği belirtilmektedir (Perrin ve ark., 2003). Cristenson ve ark. (2015) tarafından yapılan bir vaka sunumunda, bir kedi ve iki köpek besleyen, böbrek nakli yapılmış, 66 yaşındaki erkek bir hastanın bacağındaki venöz staz ülserlerini kedinin yalaması sonucu bu hastadan *P. multocida* izole ve identifiye edildiği, hastanın kardiyopulmoner yetmezlikle komplike hale geldiği ve enfeksiyona yenik düştüğü belirtilmiştir. Özellikle vahşi ya da evcil hayvanlarla teması olan immun sistemi baskılanmış bireylerde *P. multocida*'nın ciddi enfeksiyonlara yol açabileceği ve bu mikroorganizmanın dikkate alınması gerektiği üzerine durulmuştur.

Ryan ve Feder (2019) tarafından yapılan bir vaka sunum çalışmasında, hastaneye kabul edilen ve menenjitis teşhisi konulan, 12 günlük bir bebekte *P. multocida* izole ve identifiye edildiği; 6 aylık bir tedaviden sonra bebeğin normal gelişim gösterdiği, ancak bir yıl sonraki kontrolde duyu yetisini kaybettiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada *P. multocida*'nın sadece hayvan ısırıklarından değil zoonotik patojenlerin bulaşmasının hayvan yalaması sonucu salya ya da hayvanla direkt temas sonucu da olabileceği, özellikle bebeklerin pet hayvanlarından uzak tutulması gerektiği üzerine vurgu yapılmıştır.

Antibiyotik duyarlılık açısından Tel ve Keskin (2010) tarafından koyun akciğerlerinden izole edilen 76 *P. multocida* suşunun, 72 (%95)'sinin amoksisiline duyarlı olduğu, 4 (%5)'ünün ise dirençli olduğunu bildirilmiştir. Victor ve ark. (2016) tarafından Nijerya'da tavuk kolerası sebebi ile 97 tavuktan identifiye edilen 13 *P. multocida* suşunun tamamının amoksisiline dirençli olduğunu bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonucu Tel ve Keskin (2010) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarından farklı, Victor ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Abbas-Panah ve ark. (2016) tarafından sığır pnömonisi gözlemlenen sığırlarda yapılan (130 holştayn ırkı) bir çalışmada, hayvanların %80'inden *P. multocida* izole ve identifiye edildiği ve tüm suşların cephalotine karşı duyarlı olduğu belirtirken, Rigobelo ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, 90 adet tavuktan elde edilen *P. multocida* suşunun %5.1 oranında cephalotine karşı direnç gözlemlendiği belirtilmiştir. Bu çalışmada elde edilen *P. multocida* suşlarının tamamının (%100) cephalotine karşı dirençli olduğu gözlemlenmiştir. Bu farklılığın Tel ve Keskin (2010) tarafından yapılan çalışmada belirtildiği üzere sınırlı sayıda örneklemeden kaynaklanabileceği gibi izole edildiği hayvanın türüne göre mikroorganizmanın farklı suşlarından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Malezya'da tavuk kolerası vakaları görülen 13 farklı kümeden elde edilen elde edilen *P. multocida* suşunun %68 oranında streptomycine direnç gösterdiği belirtilmiştir (Sabsabi ve ark. 2021). Bu çalışmada elde edilen suşların %75'inin streptomycine karşı dirençli olduğu gözlemlenmiş olup sonuçların Sabsabi ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmadaki sonuçlara yakın olduğu gözlemlenmiştir. Weber ve ark. (1984) tarafından ABD'de insan vakalarından izole edilen 19 *P. multocida* suşunun tümünün (%100) cephaloperazona duyarlı olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada elde edilen suşların tamamı cephaloperazona karşı duyarlı olarak gözlemlenmiş olup; elde edilen bulgular Weber ve ark. (1984) tarafından elde edilen bulgularla benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak *P. multocida*'nın köpeklerin oral florasında yaygın olarak bulunduğu gözlemlenmiş, köpek ısırıkları ve salyaları ile temas halinde olan insanların bu mikroorganizmayı muhakkak göz önüne almaları gerektiği tarafımızca önerilmektedir. Yapılan kaynak araştırmalarında (Feder, 2019) *P. multocida*'nın sadece ısırıkla bulaşmadığı kedi, köpek gibi diğer hayvanların salyaları ile temas halinde olan insanların da dikkat etmeleri gerektiği sonucuna varılmaktadır. Özellikle cerrahi yaraları olan ya da organ nakli yapmış ve immun sistemi baskılanmış kişilerin bu hayvanlarla

temastan uzak durması gerekmektedir. *P. multocida*'nın nadiren de olsa bebeklerde meningitise yol açabileceğinin göz önünde bulundurulması ve bebeklerin bu hayvanlarla temasının engellenmesi gerektiği tarafımızca önerilmektedir.

### Çıkar çatışması

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

### Etik izin

Bu çalışma 15 Şubat 2014 tarih ve 2814 sayılı Resmî gazetedede yayınlanan Orman ve Su İşleri Bakanlığının "Hayvan Deneyleti Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 8. K bendi, 5. Fırkasına göre elde edilen örnekler sürüntü örneği olduğu için HADYEK iznine tabi değildir.

### Finansal destek

Bu çalışma herhangi bir kurum ya da kuruluş tarafından desteklenmemiş olup çalışmanın giderleri yazarların kendi bütçesi tarafından karşılanmıştır.

### Benzerlik Oranı

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

### Teşekkür

Bu çalışmada örneklerin eldesinde emeği geçen veteriner hekim Zekeriya ÖCAL'a ayrıca desteklerinden dolayı Çankırı Karatekin Üniversitesi Merkezi Laboratuvar (ÇANKAM) çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

### Açıklama

Bu çalışmanın özet metni 15. Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi'nde sözlü olarak sunulmuştur.

### Yazar Katkıları

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

### Kaynaklar

Abbas Panah H, Ghazvini K, Mohammadi GR, 2006: Antimicrobial susceptibility testing of *Mannheimia haemolytica* and

*Pasteurella multocida* isolated from calves with dairy calf pneumonia. *Arch Razi Inst*, 61 (2), 91-96.

Albery GF, Becker DJ, 2020: Fast-lived Hosts and Zoonotic Risk, *Trends Parasitol*, 37 (2), 117-129.

Atalay Ö, 2004: Kedi ve Köpeklerin Bazı Davranış Problemleri ve Sağaltım Seçenekleri, *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 1 (2), 147-153.

Aydoğdu M, Meral O, 2019: Sahipsiz Köpeklerin Popülasyonunun Kontrol Altına Alınması ve Buna İlişkin Hukuki Altyapının Oluşturulması, *DEÜ Hukuk Fakültesi Dergisi*, 21, 2129-2159.

Chomel BB, 2014: Emerging and Re-Emerging Zoonoses of Dogs and Cats, *Animals*, 4 (3): 434-445.

Christenson ES, Ahmed HM, Durand CM, 2015: *Pasteurella multocida* infection in solid organ transplantation. *Lancet Infect Dis*, 15 (2): 235-240.

Cockerill FR, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne*.

Giordano A, Dincman T, Clyburn BE, Steed LL, Rockey DC, 2015: Clinical Features and Outcomes of *Pasteurella multocida* Infection. *Medicine*, 94 (36).

Gündüz T, Elçioğlu Ö, Balcı Y, 2011: Beş yıllık süreçte köpek ve kedi ısırıklarının değerlendirilmesi, Eskişehir'den örnek bir çalışma. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 17 (2), 133-140.

Gürbüz A, Şahin M, 2003: Sığır ve koyunlara ait pnömonili akciğerlerden "*Pasteurella haemolytica*"nın izolasyonu, identifikasyonu, biyotiplendirilmesi ve antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, (9) 2, 169-175.

Hasan J, Hug M, 2022: *Pasteurella Multocida*. In: StatPearls. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing.

Holland KE, 2019: Acquiring a Pet Dog: A Review of Factors Affecting the Decision-Making of Prospective Dog Owners, *Animals*, 9 (4), 124.

Kannangara DW, Pandya D, Patel P, 2020: *Pasteurella multocida* infections with unusual modes of transmission from animals to humans: a study of 79 cases with 34 nonbite transmissions. *Vector-Borne and Zoonotic Dis*, 20 (9), 637-651.

Kılıç N, Sarierler M, 2003: Dog Bite Wounds: A Retrospective Study (114 Cases), *YYÜ Vet Fak Derg*, 14 (2): 86-88.

Kırışık F, Öztürk K, 2021: Şiddet Haberlerinden Hayvan Haklarına, Sahipsiz Köpek Sorunu, *Dumlupınar Üniv Sosyal Bil Derg*, 69, 360-388.

Korkmaz F, Çamaş GG, Çaycı YT, 2021: Köpek ısırığı sonrası gelişen *Pasteurella multocida*'ya bağlı yumuşak doku enfeksiyonu olgusu. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 79 (2): 307-312.

Król J, Bania J, Florek M, Pliszczak-Król A, Staroniewicz Z, 2011: Polymerase chain reaction-based identification of clinically relevant *Pasteurellaceae* isolated from cats and dogs in Poland. *J Vet Diagn Invest*, 23 (3), 532-537.

Magyar T, Lax A, 2014: Bacteria: *Pasteurella multocida*. *Encyclopedia of Food Safety*, 476-479.

Mbuthia PG, Njagi LW, Nyaga PN, Bebora LC, Minga U, Kamundia J, Olsen JE, 2008: *Pasteurella multocida* in scavenging family chickens and ducks: carrier status, age susceptibility and transmission between species. *Avian Pathol*, 37, 51-57.

Morey DF, 1994: The Early Evolution of Domestic Dog, *American Scientist*, 82: 336-347.

Oklander L I, Marino M, Zunino G E, Corach D, 2004: Preservation and extraction of DNA from feces in howler monkeys (*Alouatta caraya*). *Neotrop Primates*, 12 (2), 59-63.

Özsoy M, Yakıştıran S, Özkan E, 2002: Evaluation Of The Patients Admitted To Rabies Vaccination Department In 2000. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 59 (1), 1-6.

- Perrin I, Blanc P, Karam T, Carbajal R, 2003: Meningitis and osteitis caused by *Pasteurella multocida* in a three-month-old infant, *Arch Pediatr*, 10 (5), 439-441.
- Rollof J, Nordin-Fredriksson G, Holst E, 1989: *Pasteurella multocida* occurs in a high frequency in the saliva of pet dogs. *Scand J Infect Dis*, 21 (5), 583-584.
- Ryan JM, Feder HM, 2019: Dog licks baby. Baby gets *Pasteurella multocida* meningitis. *The Lancet*, 393(10186), e41.
- Rigobelo EC, Blackall, PJ, Maluta, RP, Ávila FAD, 2013: Identification and antimicrobial susceptibility patterns of *Pasteurella multocida* isolated from chickens and Japanese quails in Brazil. *Braz J Microbiol*, 44, 161-164.
- Sabsabi MA, Zakaria Z, Abu J, Faiz NM, 2021: Molecular characterisation and antibiotic sensitivity profile of *Pasteurella multocida* isolated from poultry farms in Malaysia, *Austral J Vet Sci*, 53, 121-126.
- Santaniello A, Garzillo S, Amato A, Sansone M, Fioretti A, Menna LF, 2020: Occurrence of *Pasteurella multocida* in Dogs Being Trained for Animal-Assisted Therapy. *Int J Environ Res Public Health*, 2 (17), 63-85.
- Tel OY, Keskin O, 2010: Koyun Akciğerlerinden *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* izolasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılığı, *YYÜ Vet Fak Derg*, 21 (1), 31-34.
- Tınmaz T, Çelik B, Halaç B, Bağcıgil FB, 2021: Characterization of *Pasteurella multocida* isolates recovered from the oral flora of cats. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 68, 15-20.
- Victor A, Mathew B, Adekemi O, Ayo A, Odunayo A, 2016: Prevalence and antibiotic resistance of *Pasteurella multocida* isolated from chicken in Ado-Ekiti metropolis. *Int J Sci World*, 4 (2), 40.
- Weber DJ, Wolfson M, John S, Morton S, Hooper D, 1984: *Pasteurella Multocida* Infections: Report Of 34 Cases And Review Of The Literature. *Medicine*, 63 (3),133-154.
- WHO, Animal Bites, <https://www.who.int/>, Erişim tarihi: 27.08.2022.
- Wilkie IW, Harper M, Boyce JD, Adler B, 2012: *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis, *Pasteurella multocida: Molecular Biology, Toxins and Infection*, 1-22.
- Wilson BA, Ho M, 2013: *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 26 (3), 631-655.





## İskenderun Körfezi'nden Yakalanan Ahtapotlarda Bisfenol A Düzeyleri

Hatice Kübra SÖNMEZATEŞ<sup>1,a</sup>, Erdiñç TÜRK<sup>1,b,\*</sup>

<sup>1</sup>Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Farmakoloji ve Toksikoloji Ana Bilim Dalı, Hatay, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0001-7488-2323

<sup>b</sup>ORCID: 0000-0003-1735-1774

Geliş Tarihi: 08.04.2023

Kabul Tarihi: 14.06.2023

**Bu makale Nasıl kaynak gösterilir:** Sönmezateş HK, Türk E. (2023). İskenderun Körfezi'nden Yakalanan Ahtapotlarda Bisfenol A Düzeyleri. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 107-111, DOI:10.31196/huvfd.1279586.

**\*Yazışma adresi:** Erdiñç TÜRK

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Farmakoloji ve Toksikoloji Ana Bilim Dalı, Hatay, Türkiye.  
e-mail: erdincturk48@gmail.com

Online erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Özet:** Bisfenol A (BPA), gıda kaplarında, diş macunlarında, tıbbi ekipmanlarda, mutfak eşyalarında, su borularında ve elektronik aletlerde yaygın olarak kullanılan endokrin bozucu kimyasal bir maddedir. BPA insanlara ve diğer canlılara kontamine gıda ve içeceklerle bulaşmaktadır. Çevresel kirleticilerin çoğunda olduğu gibi BPA kontaminasyonu en fazla göl, nehir ve denizlerde meydana gelmektedir. Bu ortamlardaki BPA miktarını tespit etmek için biyoindikatör olarak deniz canlıları kullanılmaktadır. Bu çalışmada İskenderun Körfezi'nden yakalanan ahtapotlarda BPA kirlilik seviyesini belirlemek ve tüketen insanlar için risk düzeyini ortaya koymak amaçlanmıştır. Bu kapsamda Hatay ili İskenderun Körfezi'nden elde edilen 40 adet ahtapot numunesinin kas ve deri dokularında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile BPA miktarı ölçüldü. Tüm ahtapot numunelerinde BPA düzeyi 0.349-80.313 ng/g aralığında bulunmuştur. Ahtapot numunelerinde tespit edilen bu BPA düzeyleri İskenderun Körfezinden çalışılan balık örneklerinden daha yüksek seviyede olmakla birlikte Türk Gıda Kodeksinde BPA için belirlenen spesifik migrasyon limitinin altında olduğu bulunmuştur. BPA düzeylerinin sucul ortamdaki canlılarda belirli aralıklarla izlenmesi hem çevre hem de halk sağlığı açısından önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** Ahtapot, BPA, HPLC, İskenderun Körfezi.

### Bisphenol A Levels in Octopus Caught From İskenderun Bay

**Abstract:** Bisphenol A (BPA) is an endocrine-disrupting chemical commonly used in food containers, toothpaste, medical equipment, kitchenware, water pipes, and electronic appliances. BPA is transmitted to humans and other living things through contaminated food and drink. As with most environmental pollutants, BPA contamination occurs mainly in lakes, rivers, and seas. Sea creatures are used as bioindicators to determine the amount of BPA in these environments. This study aimed to assess the level of BPA pollution in octopuses caught from İskenderun Bay and to reveal the risk level for people consuming it. In this context, the amount of BPA was measured by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) in the muscle and skin tissues of 40 octopus samples obtained from the İskenderun Bay of Hatay province. BPA level was found in the 0.349-80.313 ng/g range in all octopus samples. These BPA levels detected in the octopus samples were higher than the fish samples studied from İskenderun Bay. However they were below the specific migration limit determined for BPA in the Turkish Food Codex. Regular monitoring of aquatic organisms' BPA levels is vital for the environment and public health.

**Keywords:** BPA, HPLC, İskenderun Bay, Octopus.

## Giriş

Bisfenol A (BPA, 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan) genel olarak endüstriyel imalatta kullanılan sentetik endokrin bozucular arasında bulunan bir kimyasaldır. BPA -40 °C ile +145 °C arasında bozulmayan yapıdadır. Polikarbonat plastiklerde, polimer olmayan plastiklerde ve epoksi reçinelerde katkı maddesi olarak bulunur ve polikarbonat gıda kapları, metal kutularda, diş macunları, koruyucu kaplamalar, tıbbi ekipmanlarda, mutfak eşyaları, su boruları, kağıt ürünleri ve günlük hayatta kullandığımız birçok ürünün imalatında kullanılır (Barboza ve ark., 2020; Calafat ve ark., 2005; EFSA, 2021; Kang ve ark., 2006). 1953'de Polivinil klorürün (PVC) kullanımın yaygınlaşmasıyla birlikte BPA'nın üretimi artmıştır. Üretimde kullanılan BPA miktarı 1980'de 1.000.000 ton iken, 2019 yılında 8.000.000 tona ulaşmıştır (EFSA, 2021).

BPA'nın çevresel maruziyetinde hava ve toprağın yanında su teması da oldukça önemlidir. BPA üretiminin olduğu fabrikalarda meydana gelen atık sular arıtılmadan nehirlere, göllere ve denizlere deşarj olması sonucu su kaynaklarının kirlenmesine neden olmaktadır (Führacker ve ark., 2000; Körner ve ark., 2000; Staples ve ark., 1998). Gıda değeri olan tuzlu ve tatlı su canlıları besin zinciri yoluyla insanlarda BPA maruziyetine sebep olmaktadır. BPA'nın ayrışması (parçalanması) tatlı suya kıyasla tuzlu suda daha uzun süre aldığı için (yaklaşık bir ay) tuzlu suda yaşayan canlılarda BPA kontaminasyonunun daha fazla olması beklenir (Santhi ve ark., 2012). BPA maruziyeti insanlar başta olmak üzere tüm canlılarda endokrin sistemde bozulmalara, epigenetik modifikasyonlara ve karsinogeniteye sebep olabileceği belirtilmiştir (Cuomo ve ark., 2017).

Kafadan bacaklılar alt sınıfında yer alan ahtapot, içerdiği omega 3 ve omega 6 gibi doymamış yağ asitlerinden dolayı insanlar için önemli bir besin kaynağıdır. Yapılan çalışmalarda ahtapotların toplam yağ asitlerinin %42'sini omega 3 yağ asitlerinin (eikosapentaenoik asit) oluşturduğu bildirilmiştir (Oliveria ve ark., 2019; Zlatanov ve Sagredos, 1993). Ülkemizde özellikle Akdeniz bölgesinde ekonomik öneme sahip bir deniz canlısı olduğu belirtilmiştir (Sinanoglu ve Meimaroglu, 1998). İskenderun Körfezi endüstri ve tarımsal faaliyetlerin yoğun olduğu bir bölgedir. Sanayi kuruluşları, tarımsal faaliyetler ve gemi trafiğinden dolayı çevresel kirliliği artmaktadır. Denizde yaşayan pek çok canlı kirliliklerin belirlenmesi için biyoindikatör olarak kullanılmaktadır. Yapılan birçok çalışmada farklı deniz canlılarında BPA düzeyi araştırılmasına karşın ahtapotlarda yapılan herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Ahtapotlar gıda değeri taşıması sebebiyle kirliliğe maruz kaldıklarında besin zincirinin en üst halkası olan insan sağlığı için büyük risk oluşturmaktadır. Bu çalışmada hem gıda değeri olması hem de İskenderun Körfezi'nde BPA kirliliğinin göstergesi olarak avlanan ahtapotlarda BPA düzeyinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Ahtapot örnekleri:** Çalışmada 1000-1300 gr canlı ağırlığına sahip toplam 40 adet ahtapot (*Octopus vulgaris*) kullanıldı. Ahtapot örnekleri 2019 yılı av sezonunda, Hatay ili, İskenderun Körfezi'nde (Boylam: 36° 12' 16" E, Doğu, Enlem:

36° 39' 54" N, Kuzey) yakalanan ahtapotlardan temin edildi. Temin edilen ahtapotlar soğuk zincir altında, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi laboratuvarlarına taşınarak analiz zamanına kadar -40 °C'de muhafaza edildi. Analizler ahtapot örneklerinin toplanmasından sonra 3 ay içinde gerçekleştirildi. Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Etik Kurul onayı (16/01/2020 ve 2020/01-04) alınarak gerçekleştirilmiştir.

**BPA analizi:** Ahtapot örneklerinden BPA analizi, Kang ve Kondo tarafından (2003) süt ve süt ürünlerinde BPA analizi için kullanılan metot modifiye edilerek, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)-FLD (Floresans detektör, RF-20AXL, Shimadzu, Kyoto, Japan) yardımıyla gerçekleştirildi. Analiz için ahtapotların kas+deri (özellikle yenilebilir) dokuları kullanıldı. Kas+deri dokuları 10 000 rpm'da 10 dakika homojenize (Heidolph Silent Crusher M, Germany) edildi. Homojenize edilen ahtapot örneklerinden hassas terazi (Radwag AS 220 R2, Poland) yardımıyla 5 g tartıldı. Tartılan örnekler üzerine 30 ml hekzan (Sigma 650552, Germany) ve 30 ml asetonitril (Merck 100030, Germany) eklendi. Karışım çelik blender'e (Waring 8011EB) yerleştirildi ve 4 dakika süresince yüksek devirde karıştırıldı. Karışım filtre kâğıdı kullanılarak (Whatman No 4, Germany) süzüldü ve süzüntü ayırma hunisine alınarak hekzan fazı ile asetonitril fazı ayrılana kadar bekletildi. Altta kalan asetonitril fazı cam balon jöjeye alındı ve üstte kalan hekzan fazı uzaklaştırıldı. Cam balon jöje içerisindeki asetonitril faza evaporatörde (IKA RV 05 Basic 1B, Germany) buharlaştırma işlemi uygulandı ve altta kalan kalıntı 6 ml ultra saf su ile çözdürüldü.

Katı faz ekstraksiyon kartuşu (Sep-pak C18 kartuş, Waters, Milford, MA USA) 10 ml metanol (Merck 106018, Germany) ardından 10 ml ultra saf su geçirilerek şartlandı. Şartlanma esnasında vakum manifoldu (Lubitech BF-2500, China) kullanıldı. Ardından saf su ile çözdürülmüş olan 6 ml ekstraksiyon çözeltisi kartuştan geçirildi ve kartuştan 20 ml %5 metanol içeren saf su geçirilerek yıkama yapıldı. Kartuşta sıvı kalmaması için hava geçirilerek temizlendi. Daha sonra elüsyon aşaması için, kartuşun alt kısmına 5 ml'lik falkon tüpü yerleştirildi. Kartuş içerisinde 3 ml metanol geçirilerek elüsyon yapıldı ve cihaza 20 µL enjekte edildi. BPA'nın kromatografik ayırımında İnertsil ODS-3 kolon kullanıldı. Mobil faz olarak %45 asetonitril ve %55 ultra saf su kullanıldı ve dakikada 1 ml olacak şekilde cihaza gönderildi. Emisyon dalga boyu 308 nm (λ<sub>ex</sub>) ve eksitasyon dalga boyu 224 nm'ye (λ<sub>em</sub>) ayarlandı.

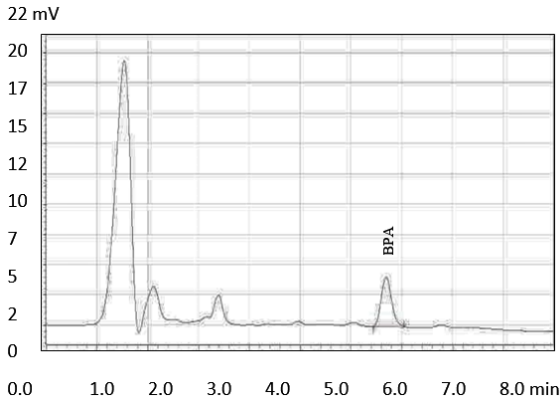
Metot validasyonunu belirlemek için doğrusalılık, özgünlük, geri kazanım, tespit sınırı ve kesinlik performans kriterleri olarak kullanıldı. Yağlı dana etine farklı konsantrasyonlarda BPA eklenerek kalibrasyon standartları (0,5, 1, 2,5, 5 ve 10 ng/g) elde edildi. Doğrusallık için kalibrasyon standartları aralığındaki kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları kullanılarak kalibrasyon eğrileri çizdirildi. Özgünlüğün değerlendirilmesinde, BPA içermeyen yağlı dana kıyımında, BPA'nın alıkonma aralığında, diğer maddelerden kaynaklanan piklerin girişim yapıp yapmaması değerlendirildi. Geri kazanımın belirlenmesi için iki farklı

kalibrasyon standardının (2 ve 6 ng/g) her bir düzeyi için 10'ar kez tekrarlı ölçüm yapıldı. Tespit limiti (LOD) ve hesaplanabilir limiti (LOQ) belirlemek için BPA'nın en düşük standart solüsyonları BPA içermeyen plazma örneklerine ilave edilerek kromatogram üzerinde S/G oranı 3 olan konsantrasyon LOD, S/G oranı 6 olan konsantrasyon LOQ olarak tespit edilmiştir. Tekrar edilebilirliğin belirlenmesi için düşük (2 ng/g) ve yüksek (6 ng/g) kalibrasyon standartları her gün 6 defa olmak üzere 6 farklı gün tekrarlandı.

**Örneklerin değerlendirilmesi:** BPA için 17 Temmuz 2013 tarihli Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Plastik Madde ve Malzemeler Tebliğinde (No: 2013/34), 'madde veya malzemeden gıdaya veya gıda benzerine geçen belirli bir maddenin izin verilen maksimum miktarı' olarak tanımlanan Spesifik Migrasyon Limiti (SML) 600 ng/g olarak belirtilmiştir (TGK, 2013). Ahtapot numunelerindeki BPA düzeyi halk sağlığı açısından Spesifik Migrasyon Limitini aşıp aşmamasına göre değerlendirilmiştir.

## Bulgular

**Metot Validasyon Bulguları:** BPA'nın alıkonma zamanı 6 dakika olarak belirlendi (Şekil 1). BPA'nın 0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 ng/g arasındaki kalibrasyon standartları için, kalibrasyon eğrisi lineerdi ( $R^2 \geq 0.9975$ ). Yağlı dana etinden BPA'nın geri kazanımı %86,6-105.4 aralığında tespit edildi. BPA'nın LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.28 ng/g ve 0.92 ng/g olarak belirlendi. Metodun gün içi tekrarlanabilirlik varyasyon katsayısı %5,6, günler arası tekrarlanabilirlik varyasyon katsayısı % 8.0 ve günler arası ve gün içi tekrar üretilebilirlik varyasyon katsayısı %9,8 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 1. BPA kromatogram görüntüsü.

**Ahtapot Örneklerinde Sonuçlar:** İskenderun Körfezi'nden yakalanan 40 adet ahtapot örneğinde ortalama BPA düzeyi  $15.841 \pm 3.00$  ng/g (0.349-80.313 ng/g) olarak tespit edilmiştir (Tablo 1). Ahtapot örneklerinde tespit edilen BPA düzeylerinin Türk Gıda Kodeksinde tanımlanan Spesifik Migrasyon Limitinin (600 ng/g) altında olduğu belirlendi.

## Tartışma ve Sonuç

BPA üreme bozuklukları, diyabet, otizm, kronik solunum hastalıkları, nörolojik bozukluklar, davranış bozuklukları, kardiyovasküler hastalıklar, renal hastalıklar, meme kanseri

Tablo 1. Ahtapot örneklerindeki BPA düzeyleri (ng/g).

Ahtapot sayısı	BPA düzeyleri	Ahtapot sayısı	BPA düzeyleri	Ahtapot sayısı	BPA düzeyleri	Ahtapot sayısı	BPA düzeyleri
1	67.712	11	8.384	21	5.624	31	2.723
2	22.378	12	13.214	22	6.538	32	8.254
3	80.313	13	19.826	23	4.325	33	9.605
4	11.338	14	8.964	24	5.906	34	9.256
5	63.851	15	16.325	25	19.106	35	4.386
6	33.510	16	4.129	26	19.745	36	0.828
7	23.590	17	13.865	27	57.762	37	2.049
8	14.716	18	14.674	28	0.349	38	4.993
9	13.837	19	2.357	29	11.744	39	7.924
10	7.169	20	7.206	30	3.304	40	1.856

ve diş gelişimi bozuklukları gibi çeşitli sağlık sorunlarıyla ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle BPA gibi endokrin bozucu özelliklere sahip maddelerden kaynaklanan olumsuz etkilere karşı kamuoyunun sağlık endişeleri son zamanlarda önemli oranda artmıştır. Epoksi reçinelerin üretiminde, polikarbonat plastiklerde, oyuncaklarda, metal kutularda, içme kaplarında, su borularında, spor için kullanılan güvenlik ekipmanlarında, gözlük camlarında, tıbbi ekipmanlarda, diş dolgularında, mikrodalga fırın kaplarında, kullandığımız elektronik aletlerde, içecek ve yiyecek kaplarında bulunan BPA'nın, hava, su ve gıdalara migrasyonu sonucu insan ve diğer canlıların maruz kalması kaçınılmazdır. BPA'ya maruziyet diğer yollara kıyasla en sık kontamine olmuş gıdalarla gerçekleşir. BPA kirliliğinin en yoğun gözlemlendiği yerler antropojenik etkiler nedeniyle tatlı ve tuzlu su kaynaklarıdır (Kang ve ark., 2006; Michalowicz, 2014). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA, 2021) raporuna göre insan beslenmesinin bir parçası olan balık ve deniz ürünleri, en yüksek BPA kontaminasyon kaynaklarından birisidir. Bu nedenle gıda değeri olan ve suda yaşayan canlılarda BPA düzeyi tespitinin yapılması önem arz etmektedir. Analizi yapılan 40 adet ahtapot örneğinin tamamında farklı düzeylerde BPA tespit edilmiştir. HPLC ile yapılan analiz sonucunda ahtapotların yenilebilir dokularındaki ortalama BPA düzeyi  $15.841 \pm 3.00$  ng/g (0.349-80.313 ng/g) olarak belirlenmiştir. Yapılan literatür taramasında daha önce ahtapotlarda BPA tespitine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamıştır. Bu nedenle bu araştırma sonuçları diğer deniz canlılarında BPA düzeyi ile ilgili yapılan çalışmalar ile karşılaştırılmıştır.

Balıklar üzerinde yapılan çalışmalarda BPA düzeyleri ülkelere ve balık türlerine göre oldukça değişkenlik göstermiştir. BPA düzeyi; Avrupa ve Kuzey Afrika'dan toplanan çipura örneklerinde  $17 \pm 1$  pg/g, alabalık örneklerinde  $130 \pm 10$  pg/g, hake balığı örneklerinde  $63 \pm 4$  pg/g (Azzouz ve ark., 2019), Hollanda da nehir ve kanallardan yakalanan balık numunelerinde 1-5 ng/g ve nehirlerin denize döküldüğü yerde yakalanan balık kas numunelerinde 0-11 ng/g (Belfroid ve ark., 2002), İtalya'nın Tiren denizinde yakalanan balıkların kas dokusunda 0.15-5 ng/g (Mita ve ark., 2011), Tayvan'nın Dan-Shui nehrinden toplanan balıkların kas dokusunda  $33.6 \pm 68.5$  ng/g ve karaciğer dokusunda  $328 \pm 647$  ng/g (Chen ve ark., 2014), Malezya'nın farklı

bölgelerinden elde edilen balıklarda  $0.023\pm 0.015$ - $0.322\pm 0.094$  ng/g (İsmail ve ark., 2018) ve ülkemiz İskenderun Körfezi'nde yakalanan patlagöz mercan balığı, çipura balığı, levrek balığı ve kefal balığında sırasıyla  $0.50\pm 0.25$  ng/g,  $0.44\pm 0.25$  ng/g,  $0.22\pm 0.13$  ng/g ve  $0.33\pm 0.19$  ng/g olarak tespit edilmiştir (Günay, 2020). Balıklarda tespit edilen BPA düzeyi incelendiğinde, Tayvan'dan elde edilen balıklar hariç bizim ahtapotlarda tespit ettiğimiz BPA düzeyinin (ortalama:15.841 ng/g) altında olduğu belirlendi. BPA'nın çökelti halinde deniz dibinde (sediment) bir aydan daha uzun süre bozulmadan kalabildiği bildirilmiştir (Peng ve ark., 2007). Ahtapotlar denizin tabanında veya tabana yakın yerlerde yaşar. Genel olarak BPA düzeyinin ahtapotlarda balıklardan yüksek olmasının nedeni denizin tabanında yaşamalarına bağlı olarak daha çok BPA'ya maruz kalmalarından olabilir. Daha önce Wei ve ark. (2011) tarafından Çin'de yapılan bir çalışmada dipten beslenen çamur balıklarında BPA konsantrasyonunun daha yüksek bulunması da düşüncemizi desteklemektedir.

Diğer deniz canlılarında BPA düzeyi ile ilgili çalışmalar incelendiğinde; Portekizden toplanan kalamarda  $22\pm 1$  pg/g, İspanyadan toplanan pişmiş yengeçlerde  $4.6\pm 0.3$  pg/g, istiridyelerde  $32\pm 2$  pg/g (Belfroid ve ark., 2002), Yunanistan'ın Ege kıyısından toplanan midyelerde  $0-626.3$  ng/g (Gatidou ve ark., 2010), Kuzey Adyatik Denizindeki çiftliklerden toplanan midyelerde  $<0.03-0.55$  pg/g ve açık denizden toplanan midyelerde  $<0.03-0.46$  pg/g (Cerkvenik-Flajs ve ark., 2018) ve Basra Körfezi'nden avlanan karides ve kum yengesinde sırasıyla  $9.50\pm 4.45$  ve  $6.02\pm 0.68$  ng/g (Akhbarzadeh ve ark., 2020) düzeyinde BPA ölçüldüğü belirtilmiştir. Midyede tespit edilen BPA düzeyleri bölgelere göre önemli farklılıklar göstermektedir. Ege denizinden toplanan midyelerde tespit edilen en yüksek BPA düzeyi ( $0-626.3$  ng/g) ahtapotlarda tespit edilen düzeyin ( $0.349-80.313$  ng/g) oldukça üzerinde idi. Bunun muhtemel nedeni midyelerinde deniz dibinde yaşaması olabilir. Deniz canlılarında BPA düzeyinin farklılık göstermesinin nedeni ülkeler arasında artılmamış endüstriyel ve evsel atıkların, düzenli depolama atıklarının ve atmosferik kirlenmelerin yağmur suyu ile denizlere taşınmasındaki farklılıklardan kaynaklanabilir.

Türk Gıda Kodeksine göre gıdayla temas eden maddelerden kaynaklanabilen spesifik migrasyon değeri  $600$  ng/g olarak belirtilmiştir (TGK, 2013). Bu çalışmada ahtapotlarda elde edilen BPA düzeyleri  $0.349-80.313$  ng/g arasında değişiyordu. Bu sonuçlar İskenderun körfezinde yakalanan ahtapotlarda insan sağlığı üzerine zararlı olacak düzeyde BPA olmadığını göstermektedir. Aynı zamanda denizlerde gıda olarak tüketimi olan canlıları biyoindeksör olarak ekosistemin kirliliğini ölçmek için kullanılabilir. Bu çalışma sonuçları İskenderun Körfezi'ndeki BPA düzeyini gıda kodeksinde belirtilen değerlerin altında göstermektedir. Ancak bölgeler arasındaki farklılıklar ve sanayi atıklarının artmasının BPA düzeyini artıracakları unutulmamalıdır.

Sonuç olarak İskenderun körfezinde yakalanan ahtapotlarda BPA düzeyinin gıdalarda belirtilen maksimum kalıntı limitinin altında olduğu görüldü. Bu sonuçlar İskenderun körfezindeki BPA düzeyinin insan sağlığına zarar vermeyecek düzeyde olduğunu göstermektedir. Ancak

sanayi gelişimin artması ve bölgeler arasında çevre kirliliğinin farklılık gösterebileceğinden dolayı bu tarz çalışmaların farklı bölgelerde ve farklı deniz canlılarında belirli aralıklarda tekrar edilmesi gerekmektedir.

## Çıkar çatışması

Yazarlar, bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## Etik izin

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu, Etik Kurul onayı (16/01/2020 ve 2020/01-04) alınarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca yazarlar Araştırma ve Yayın Etiğine uyulduğunu beyan etmişlerdir.

## Finansal destek

Bu araştırma, "İskenderun Körfezi'nden Yakalanan Ahtapotlarda Bisfenol A Düzeylerinin Belirlenmesi" başlıklı Yüksek lisans tezinden özetlenmiştir. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi BAP tarafından finanse edilmiştir. Proje No: 20.YL.013.

## Benzerlik Oranı

Makalenin benzerlik oranının sisteme yüklenen raporda belirtildiği gibi % 8 olduğunu beyan ederiz.

## Teşekkür

Bu çalışmada finansal desteklerini veren Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi BAP koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimizi sunarız.

## Açıklama

International Aegean Symposium On Natural & Medical Sciences-(11 March 12-13, 2021) kongresinde sözlü sunum olarak sunulmuştur.

## Yazar Katkıları

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

## Kaynaklar

Akhbarzadeh R, Moore F, Monteiro C, Fernandes, JO, Cunha SC, 2020: Trophic transfer, and health risk assessment of

- bisphenol analogues in seafood from the persian gulf. *Mar Pollut Bull*, 154,111036.
- Azzouz A, Colón LP, Souhail B, Ballesteros E, 2019: A multi-residue method for gc-ms determination of selected endocrine disrupting chemicals in fish and seafood from european and north african markets. *Environ Res*, 178, 108727.
- Barboza LGA, Cunha SC, Monteiro C, Fernandes JO, Guilhermino L, 2020: Bisphenol A and its analogs in muscle and liver of fish from the NorthEast Atlantic Ocean in relation to microplastic contamination. Exposure and risk to human consumers. *J Hazard Mater*, 393, 122419.
- Belfroid A, Van VM, Van DHB, Vethaak D, 2002: Occurrence of bisphenol a in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemosphere*, 49, 97-103.
- Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, 2005: Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*, 113, 391-395.
- Cerkvenik-Flajs V, Fonda I, Gombač M, 2018: Analysis and occurrence of bisphenol a in mediterranean mussels (*mytilus galloprovincialis*) sampled from the slovenian coastal waters of the north adriatic sea. *Bull Environ Contam Toxicol*, 101, 439-445.
- Chen WL, Gwo JC, Wang GS, Chen CY, 2014: Distribution of feminizing compounds in the aquatic environment and bioaccumulation in wild tilapia tissues. *Environ Sci Pollut Res*, 21, 11349- 11360.
- Cuomo D, Porreca I, Cobellis G, Tarallo R, Nassa G, 2017: Carcinogenic risk and bisphenol a exposure: a focus on molecular aspects in endoderm derived glands. *Mol Cell Toxicol*, 457, 20-34.
- EFSA. Draft Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol a (bpa) in foodstuffs. erişim: [www.efsa.europa.eu/sites/default/files/con-sultation/130725.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/con-sultation/130725.pdf). Erişim tarihi; 10.03.2021.
- Fürhacker M, Scharf S, Weber, H. 2000: Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere*, 41,751-756.
- Gatidou G, Vassalou E, Thomaidis NS, 2010: Bioconcentration of selected endocrine disrupting compounds in the mediterranean mussel, *mytilus galloprovincialis*. *Mar Pollut Bull*, 60, 2111-2116.
- Günay Y, 2020: İskenderun körfezi balıklarında bisfenol a (bpa) düzeylerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, HMKÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hatay.
- Ismail NAH, Wee SY, Aris AZ, 2018: Bisphenol A and alkylphenols concentrations in selected mariculture fish species from pulau kukup, johor, Malaysia. *Mar Pollut Bull*, 127, 536-540.
- Kang JH, Kondo F, 2003: Determination of bisphenol a in milk and dairy products by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Food Prot*, 66, 1439-1443.
- Kang JH, Kondo F, Katayama Y, 2006: Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, 226, 79-89.
- Körner W, Bolz U, Süßmuth W, Hiller G, Schuller W. 2000: Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere*, 40, 1131-1142.
- Michałowicz J, 2014: Bisphenol A—sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol*. 37, 738-758.
- Mita L, Bianco M, Viggiano E, Zollo F, Bencivenga U, 2011: Bisphenol A content in fish caught in two different sites of the tyrrhenian sea (Italy). *Chemosphere*, 82, 405-410.
- Oliveira H, Muniz JA, Bandarra NM, Castanheira I, Coelho IR, Delgado I, Gonçalves S, Lourenço HM, Motta C, Duarte MP, Nunes ML, Gonçalves A, 2019: Effects of industrial boiling on the nutritional profile of common octopus (*Octopus vulgaris*). *Foods*, 8, 411.
- Peng X, Wang Z, Mai, B, Chen F, Chen S, 2007: Temporal trends of nonylphenol and bisphenol a contamination in the pearl river estuary and the adjacent south china sea recorded by dated sedimentary cores. *Sci Total Environ*, 384, 393-400.
- Santhi VA, Hairin T, Mustafa AM, 2012: Simultaneous determination of organochlorine pesticides and bisphenol a in edible marine biota by GC-MS. *Chemosphere*, 86, 1066-1071.
- Sinanoglu VJ, Meimaroglu SM, 1998: Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) mediterranean cephalopods. *Food Res Inter*, 31, 467-473.
- Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR, 1998: A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, 36, 2149-2173.
- TGK, 2013: 17/7/2013 tarihli ve 28710 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Plastik Madde ve Malzemelerin Bileşenlerinin Migrasyon Testinde Kullanılan Gıda Benzerleri Listesi Tebliği.
- Wei X, Huang Y, Wong MH, Giesy JP, Wong C, 2011. Assessment of risk to humans of bisphenol a in marine and freshwater fish from pearl river delta, china. *Chemosphere*, 85, 122-128.
- Zlatanov S, Sagredos AN 1993: The fatty acids composition of some important mediterranean fish species. *Fett/Lipid*, 95, 66-69.



## The Effects of Regular Treadmill Exercise on Some Blood Parameters in Diabetes Mellitus

Canan CEYLAN<sup>1,a,\*</sup>, Mehmet ÖZSAN<sup>2,b</sup>, Nurcan DÖNMEZ<sup>3,c</sup>

<sup>1</sup>Selcuk University, Health Sciences Institute Department of Physiology, Konya, Türkiye.

<sup>2</sup>Bartın University, Faculty of Education, Bartın, Türkiye.

<sup>3</sup>Selcuk University, Veterinary Faculty, Department of Physiology, Konya, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-0424-4403

<sup>b</sup>ORCID: 0000-0001-9546-3478

<sup>c</sup>ORCID: 0000-0003-4271-598X

Received: 11.04.2023

Accepted: 20.06.2023

**How to cite this article:** Ceylan C, Özsan M, Dönmez N. (2023). The Effects of Regular Treadmill Exercise on Some Blood Parameters in Diabetes Mellitus. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 112-117, DOI:10.31196/huvfd.1281402.

**\*Correspondence:** Canan CEYLAN

Selcuk University, Health Sciences Institute Department of Physiology, Konya, Türkiye.

e-mail: [cncyn1@gmail.com](mailto:cncyn1@gmail.com)

Available on-line at: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Abstract:** This study aims to determine the effects of regular treadmill exercise on some blood parameters in rats with an experimental diabetes model. In the study, 36 Wistar Albino rats were divided into four groups Control (C), Exercise (E), Diabetes (D), and Diabetes+Exercise (DE). A single dose of 60 mg/kg STZ solution was injected intraperitoneally (i.p) into the D and DE groups to create a diabetes model. After diabetes induction, E and DE groups were given running exercises at 20 m/min and 45 minutes daily for four weeks. According to the data obtained, while lipid profile (TC, LDL, TG) and liver enzyme (ALT, AST) levels increased significantly in group D compared to group C, HDL and TP levels were found to decrease. However, a decrease was observed in parameters other than HDL and TP in the DE group. It was also observed that the mineral and vitamin (Vit D, Ca, Mg, and Zn) levels decreased in the D group compared to the C group, while these values tended to increase in the DE group. As a result, the experiment shows that a four week regular exercise program in rats with diabetes has a therapeutic, preventive, and protective effect on lipoprotein levels, liver enzyme markers, and micronutrient levels.

**Keywords:** Diabetes Mellitus, Exercise, Lipid profile, Liver enzymes, Micronutrients.

### Diabetes Mellitus'ta Düzenli Koşu Bandı Egzersizinin Bazı Kan Parametreleri Üzerindeki Etkisi

**Özet:** Bu çalışma, deneysel diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda düzenli koşu bandı egzersizinin bazı kan parametreleri üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçlamaktadır. Çalışmada 36 adet Wistar Albino rat Kontrol (K), Egzersiz (E), Diyabet (D) ve Diyabet+Egzersiz (DE) olmak üzere dört gruba ayrıldı. D ve DE gruplarına diyabet modeli oluşturmak için tek doz 60 mg/kg STZ solüsyonu intraperitoneal (i.p) olarak enjekte edildi. Diyabet indüksiyonu sonrası, E ve DE gruplarına dört hafta boyunca, 20 m/dk hızda ve günlük 45 dk. koşu egzersizi yaptırıldı. Elde edilen verilere göre, K grubuna göre D grubunda lipid profil (TK, LDL, TG) seviyeleri ile karaciğer enzim (ALT, AST) düzeyleri önemli ölçüde artış gösterirken, HDL ve TP düzeylerinin azaldığı tespit edildi. Ancak DE grubunda HDL ve TP dışındaki parametrelerde bir düşüş gözlemlendi. Yine K grubuna oranla D grubunda mineral ve vitamin (Vit D, kalsiyum, magnezyum ve çinko) seviyelerinin azaldığı gözlemlenirken, DE grubunda bu değerlerin artma eğiliminde olduğu belirlendi. Sonuç olarak, deneysel diyabetli sıçanlarda dört haftalık düzenli egzersiz programının lipoprotein seviyeleri, karaciğer enzim belirteçleri ve mikro besin seviyeleri üzerinde terapötik, önleyici ve koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Diabetes Mellitus, Egzersiz, Karaciğer enzimleri, Lipid profili, Mikro besinler.

## Introduction

Diabetes Mellitus (DM) is a significant public health problem with an increasing prevalence worldwide and is among the primary causes of morbidity and mortality. DM, characterized by chronic hyperglycemia, is a metabolic disease mainly caused by the inability of pancreatic  $\beta$  cells to produce sufficient insulin hormone, resulting in impaired insulin secretion, the resistance of peripheral tissues to insulin, or both (Kilincarslan and Donmez, 2019).

The liver plays a vital role in lipid metabolism by mediating lipid metabolite production, storage, and transport (Hatipoğlu and Kahraman, 2021). Cholesterol plays an essential role in the pathogenesis of diabetes because of its effect on the structure and function of the pancreatic  $\beta$ -cell membrane (Perego et al., 2019). An increase in total cholesterol, triglycerides, and LDL levels in DM and a decrease in HDL levels cause dyslipidemia (Jialal and Singh, 2019). In addition, hyperlipidemia leads to liver enzyme abnormalities (Kathak et al., 2022).

Chronic hyperglycemia, which is the main symptom of DM, causes serious changes in the condition of micronutrient elements (vitamins, minerals, and trace elements) in the body. Micronutrients increase the efficiency and sensitivity of insulin by providing hormonal control with the activation of insulin receptor sites and acting as cofactors or components for enzyme systems involved in glucose metabolism. It also shows an antioxidant effect preventing tissue oxidation (Gürbüz and Çelik, 2019). Many trace elements are involved in the organism at physiological and biochemical levels. Changes in element levels vary depending on the type, duration, intensity of exercise, and nutritional behavior (Pourvaghar and Shahsavari, 2010).

Regular exercise central to improving glucose homeostasis by increasing glucose uptake by tissues by increasing insulin sensitivity and response in insulin-dependent tissues such as adipocytes and myocytes (Yaribeygi et al., 2019). With the exercise protocols applied, blood cholesterol and triglyceride plasma levels decrease; it decreases fatty acid oxidation in pancreatic  $\beta$  cells by expressing lipogenesis enzymes in the liver by reducing LDL and increasing HDL levels. This therapeutic efficacy of exercise on the organism is offered as a treatment option for lowering metabolic and cardiovascular risk factors (Balducci et al., 2014; O'hagan et al., 2013).

This study aims to determine the effect of regular aerobic exercise training on serum lipid parameters, liver enzyme levels, and some micronutrient levels in rats with an experimental diabetes model.

## Materials and Methods

**Animal Study Design:** In the study, 36 Wistar Albino rats with similar live weights and six weeks old were used. The subjects were obtained from Selçuk University Experimental Medicine Application and Research Center (SUDAM). Selçuk University Faculty of Veterinary Medicine Experimental Animal Production and Research Center Ethics Committee

(SUV DAMEK) approved the research plan and project with the number 2023-50. Subjects in the SUDAM unit were housed in plastic cages at  $23\pm 2$  °C room temperature and  $50\pm 10\%$  humidified environment with 12/12 night/day light cycles. Standard rat chow and daily fresh water were given ad libitum to the subjects during the study. Animals were divided into Control (C), Exercise (E), Diabetic (D), and Diabetic+Exercise (DE) groups.

**Experimental Diabetes Procedure:** A single dose of 60 mg/kg STZ (Sigma S0130-1G) solution was dissolved in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5) and injected intraperitoneally (i.p) to form a diabetes model in the D and DE groups. After fasting for 72 hours, blood glucose was monitored from the tail with a blood glucose meter (plusMED). Subjects with blood glucose above 250 mg/dl were considered diabetic (Dönmez et al., 2020).

**Running Exercise Protocol:** Subjects started the treadmill exercise program after diabetes induction. The groups (E and DE) who were taken to the SUDAM experimental treadmill exercise practiced for two days at a speed of 15m/min and for 15 minutes as a process of adaptation to the exercise. They then started the experimental phase for 45 minutes daily at 20 m/min for four weeks (Ugurlu et al., 2022). After the four-week trial, enough blood was taken from the subjects under anesthesia (thiopental anesthesia, 40 mg/kg) by heart puncture and into anticoagulant tubes.

**Hematological Analysis:** In the serums obtained from the blood samples taken at the end of the trial total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), triglyceride (TG), total protein (TP), alanine aminotransferase test (ALT), aspartate aminotransferase test (AST), vitamin D (vit D), calcium (Ca), magnesium (Mg) and zinc (Zn) the levels were determined by chemiluminescent method on the Abbott C8000 device in accordance with the commercial kit (Abbott) protocol.

**Statistical Analysis:** Statistical analysis of the data obtained at the end of the experimental study and the determination of the importance of the differences between groups were carried out by using the SPSS 26.0 package program and by using Duncan's Multiple Range tests in the analysis of variance ( $p<0.05$ ).

## Results

The data obtained at the end of the experimental study are presented below in Table 1 and 2.

## Discussion

Type 2 DM, associated with hyperglycemia and hyperinsulinemia, causes diabetic dyslipidemia by causing some disorders in the production and metabolism of plasma lipoproteins (Tangvarasittichai, 2015). Evidence from existing studies highlights a strong association between hyperlipidemia and diabetes. Many studies on this subject

**Table 1.** The effect of exercise training on lipid profiles and liver enzyme levels in experimental diabetic rats.

	C (n=6)	E (n=10)	D (n=10)	D+E (n=10)
TC (mg/dl)	95,00±0,97 <sup>b</sup>	91,42±0,85 <sup>b</sup>	140,20±1,35 <sup>a</sup>	105,70±1,86 <sup>ab</sup>
HDL (mg/dl)	39,83±1,33 <sup>b</sup>	48,63±1,48 <sup>a</sup>	24,60±1,07 <sup>c</sup>	34,42±1,21 <sup>bc</sup>
LDL (mg/dl)	53,30±1,21 <sup>b</sup>	40,21±0,88 <sup>c</sup>	116,72±2,14 <sup>a</sup>	72,12±1,39 <sup>ab</sup>
TG (mg/dl)	66,34±0,63 <sup>b</sup>	61,50±0,62 <sup>b</sup>	109,90±6,18 <sup>a</sup>	95,53±1,02 <sup>ab</sup>
TP (g/L)	68,65±0,26 <sup>b</sup>	70,92±0,31 <sup>a</sup>	57,22±0,44 <sup>c</sup>	61,52±0,34 <sup>bc</sup>
ALT (U/L)	53,15±1,18 <sup>c</sup>	60,51±0,52 <sup>b</sup>	111,60±1,72 <sup>a</sup>	89,35±2,49 <sup>ab</sup>
AST (U/L)	84,90±1,38 <sup>c</sup>	89,80±0,56 <sup>b</sup>	144,84±0,73 <sup>a</sup>	112,70±0,98 <sup>ab</sup>
Vit D (ng/ml)	3,77±0,17 <sup>a</sup>	3,98±0,20 <sup>a</sup>	1,90±0,17 <sup>b</sup>	2,57±0,11 <sup>ab</sup>

a, b, c; The difference between the mean values shown with different letters for the same parameter on the same line is significant. ( $p < 0.05$ ).

**Table 2.** The effect of exercise training on Ca, Mg and Zn levels in experimental diabetic rats.

	C (n=6)	E (n=10)	D (n=10)	D+E (n=10)
Ca (mg/dl)	10,64±0,21 <sup>a</sup>	11,04±0,71 <sup>a</sup>	6,80±0,09 <sup>b</sup>	7,41±0,08 <sup>ab</sup>
Mg (mg/dl)	2,82±0,04 <sup>a</sup>	3,00±0,18 <sup>a</sup>	1,52±0,09 <sup>b</sup>	1,90±0,04 <sup>ab</sup>
Zn (ug/dl)	81,79±0,95 <sup>a</sup>	83,46±1,80 <sup>a</sup>	47,25±0,55 <sup>b</sup>	54,20±1,23 <sup>ab</sup>

a, b, c; The difference between the mean values shown with different letters for the same parameter in the same line is significant ( $p < 0.05$ ).

indicate that TC, TG, and LDL levels in diabetics show a significant increase compared to the control, but HDL levels decrease (Abdella Baragob et al., 2014; Amaechi et al., 2015; Hadi et al., 2023). In our findings, significantly increased lipid profiles (TC, TG, LDL) and decreased HDL levels were observed in the experimental diabetes group compared to the control group (Table 1). The lipoprotein lipase (LPL) enzyme, which provides lipoprotein regulators and hydrolysis of triglycerides, is activated by insulin. However, hyperlipidemia occurs due to the inability to activate the LPL enzyme due to insulin resistance in diabetic conditions. In addition, insufficient insulin secretion and/or insulin deficiency activates the hormone-sensitive lipase enzyme, increasing the transport of free fatty acids from adipose tissue and causing an increase in lipoprotein levels (TC, TG, and LDL) and a decrease in HDL (Makinde et al., 2020).

Disturbances in lipoprotein levels in DM also affect liver metabolism, causing hepatic dysfunction. ALT and AST, produced by the liver are specific markers used to determine liver damage (Kalas et al., 2021). Studies have reported that ALT and AST levels are significantly increased in diabetic subjects compared to the control group (Hadi et al., 2023; Kılıçarslan and Dönmez, 2016; Yazdi et al., 2019). Our results determined that liver enzymes (ALT, AST) were significantly increased in the diabetes group compared to the control group (Table 1). Chronically high glucose levels in DM

increase hepatic enzyme levels due to oxidative stress and subsequent carbohydrate, protein, and lipid metabolism dysfunction. Therefore, the increase in enzyme levels causes cellular damage and destruction of liver tissue (Ahangarpour et al., 2018; Mohamed et al., 2016).

Although there are studies that report that total protein levels increase in diabetes (Malawadi & Adiga, 2016; Riaz et al., 2018), some studies indicate a decrease in these protein levels (Analike et al., 2019; Makinde et al., 2020). When the data obtained from the study were examined, it was determined that the total protein levels decreased significantly in the diabetes group compared to the control group (Table 1). In conclusion, it can be said that total proteins, which provide hemostasis and coagulation and play an important role in immunity, have a specific role in the pathology and complications of diabetes. In addition, a marked decrease in total protein levels indicates diabetes-induced liver tissue damage. Therefore, hyperglycemia associated with diabetes causes the breakdown of structural proteins by increasing the conversion of amino acids to glucose, negatively affecting the synthesis of total proteins such as albumin and globulin (Ekperikpe et al., 2019; Goboza et al., 2019).

In many studies, it has been reported that lipid profiles, including TC, TG, and LDL, decreased in the exercise-applied diabetes group compared to diabetic subjects, while HDL



levels increased significantly (Aly et al., 2016; Eldin et al., 2021; Mohammad et al., 2019). This study observed an increase in HDL levels and a decrease in lipid profile parameters (TC, TG, LDL) in diabetic rats who underwent running exercise compared to the diabetes group (Table 1). Some researchers report that exercise can increase LPL enzyme activation and decrease hepatic triglyceride lipase (Liu & Wang, 2014). In conclusion, increased LPL activation with exercise causes an increase in the metabolism of lipoproteins, resulting in a decrease in LDL levels.

Mohammed et al. (2019) reported that ALT and AST levels of the moderate-intensity exercise program applied to diabetic subjects decreased significantly compared to diabetic subjects, but liver enzymes approached control after high-intensity exercise. Again, in studies on individuals with type 2 DM and on experimental animals, it has been reported that exercise reduces ALT and AST values (Akbari et al., 2020; RamzanPour et al., 2014). The data obtained from the study are compatible with these studies (Table 1), suggesting that regular and long-term exercise programs can minimize damage to various tissues and organs, such as the liver, skeletal muscle, and heart, and have a protective effect.

It is among the reports that physical exercise causes temporary increases in liver enzyme levels (Pettersson et al., 2008; Sjögren, 2007). There has been reported to be an increase in liver enzyme levels after various exercise protocols and competitions applied in both experimental animals and athletes in different branches (Kaynar et al., 2016; Lenaerts et al., 2005; Qureshi et al., 2022). Studies reported in the literature are similar to our findings (Table 1). In some studies, while no change is observed in the liver enzyme levels of exercise (Bürger-Mendonça et al., 2008; Lippi et al., 2011), it is stated that long-term aerobic exercise reduces these enzymes (Khaoshbaten et al., 2013; Yao et al., 2018). As a matter of fact, exercise duration and intensity may reveal different results in liver enzyme levels.

Although studies examining the effect of exercise on total proteins are limited, some studies indicate an increase in total protein levels after exercise (Ahmadizad & El-Sayed, 2005; Gailliüniénè et al., 2007). In the findings of the study, an increase in total protein levels was observed in the exercise group compared to the control group (Table 1).

Clinical studies report that micronutrient metabolism is a prominent factor in diabetes pathogenesis and progression (Khan and Awan, 2014; Mooren et al., 2011), leading to abnormal micronutrient concentrations in rodent models of diabetes (Ragbetli et al., 2014). Pittas et al. (2007) reported that changes in vitamin D and calcium levels play a role in the development of T2DM. Again, many studies in clinical and experimental animal models report that vit D and calcium levels are significantly reduced in subjects with DM compared to controls (Aly et al., 2016; Butola et al., 2020; Rana et al., 2016). Our results showed that diabetic rats had significantly lower vitamin D and calcium levels than the control (Tables 1 and 2). In conclusion, it can be said that the primary mechanism of action of vitamin D on insulin secretion and synthesis, calcium-dependent insulin

secretion, and changes in calcium concentrations affect the secretion of  $\beta$  islets, leading to DM and related symptoms.

Data on low magnesium levels in the diabetic group in both human and experimental studies are supported by our results from the study (Table 2) (Dhavane and Dhavane, 2022; Gómez et al., 2017; Yang et al., 2011). Thus, although the cause of hypomagnesemia, which is common in diabetes, is not clear, it can be explained by increased urinary magnesium losses due to glucosuria and osmotic diuresis. In addition, hypomagnesemia resulting from chronic hyperglycemia in diabetes may lead to vascular complications of diabetes (Barbagallo and Dominguez, 2015). It has been reported that low plasma and serum zinc levels are associated with decreased insulin sensitivity and hyperglycemia (da Silva Bandeira et al., 2017). There are studies reporting that serum zinc levels are significantly reduced in experimental models and diabetic subjects compared to control subjects (Duzguner and Kaya, 2007; Gagandeep et al., 2015; Gómez et al., 2017; Kumar et al., 2014). Our data showed that serum zinc levels were significantly decreased in diabetic subjects compared to the control (Table 2). As a result, it suggests that the zinc deficiency observed in DM leads to a decreased zinc concentrations due to increased urinary excretion of zinc by transporting it to the kidney tubules.

Vitamin D and its receptors significantly affect muscle tissue by improving muscle fiber and muscle strength by providing the efficiency and transport of calcium, mediating muscle contraction. It has been reported that magnesium and zinc may have a significant effect on energy metabolism and performance (Aly et al., 2016; Huskisson et al., 2007). In the findings obtained from the study, the values of Vit D, calcium, magnesium, and zinc tend to increase after running exercise both in the exercise group and in diabetic rats (Tables 1 and 2). Parallel to these results, some studies have reported that these parameters increase after exercise (Aly et al., 2016; Baydil, 2013; Bicer et al., 2011).

## Conclusion

The study suggests that a four-week regular exercise program has a therapeutic, preventive, and protective effect on lipoprotein levels, liver enzyme markers, and micronutrient levels in rats with experimental diabetes.

## Conflict of Interest

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

## Ethical Approval

Selcuk University Faculty of Veterinary Medicine Experimental Animal Production and Research Center Ethics Committee (SUVDAMEK) approved the research plan and project with the number 2023-50.

## Funding

This study was supported by Selcuk University Scientific Research Projects Coordinatorship with project number 21212026.

## 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: CC, MÖ, ND  
 Design: CC, MÖ, ND  
 Control/Supervision: ND  
 Data Collection and / or Processing: CC, ND  
 Analysis and / or Interpretation: CC, MÖ, ND  
 Literature Review: CC, MÖ  
 Writing the Article: CC, MÖ  
 Critical Review: ND

## References

- Abdella Baragob AE, AlMalki WH, Farag Alla HEH, Ibrahim A, Muhammed SK, & Abdella S, 2014: Investigate evaluation of oxidative stress and lipid profile in STZ-induced rats treated with antioxidant vitamin. *Pharm Pharmacol*, 5 (03), 272-279.
- Ahangarpour A, Shabani R, & Farbood Y, 2018: The effect of betulinic acid on leptin, adiponectin, hepatic enzyme levels and lipid profiles in streptozotocin–nicotinamide-induced diabetic mice. *Res Pharm Sci*, 13 (2), 142.
- Ahmadizad S, & El-Sayed MS, 2005: The acute effects of resistance exercise on the main determinants of blood rheology. *J Sports Sci*, 23 (3), 243-249.
- Akbari A, Tadibi V, & Behpoor N, 2020: Effect of Aerobic Exercise Combined With Stevia Extract Supplementation on Selected Liver Enzymes in Diabetic Rats. *CMJA*, 10 (3), 244-257.
- Aly YE, Abdou AS, Rashad MM, & Nassef MM, 2016: Effect of exercise on serum vitamin D and tissue vitamin D receptors in experimentally induced type 2. *Diabetes Mellitus. J Adv Res*, 7 (5), 671-679.
- Amaechi D, Udosen E, Edet E, Asanga E, & Mbakwe I, 2015: Lipid profile status of streptozotocin induced diabetic rats treated with ethanolic leaf extract of *Solenostemon monostachyus*. *J Med Plant Res*, 9 (8), 289-293.
- Analike RA, Ihim A, Iweanya S, Ogbodo E, Onah C, Asomugha A, Amah A, Obi P, Nwobodo E, & Timothy C, 2019: Assessment of glycated haemoglobin, total protein and albumin levels in patients with type 2 diabetes mellitus visiting NAUTH, Nnewi. *Indian J Pathol Oncol*, 6 (4), 700-703.
- Balducci S, Sacchetti M, Haxhi J, Orlando G, D'Errico V, Fallucca S, Menini S, & Pugliese G, 2014: Physical exercise as therapy for type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*, 30 (S1), 13-23.
- Barbagallo M, & Dominguez LJ 2015: Magnesium and type 2 diabetes. *World J Diabetes*, 6 (10), 1152.
- Baydil B, 2013: Serum macro-micro element responses to acute maximal physical exercise. *World Appl Sci J*, 23 (7), 945-949.
- Bicer M, Akil M, Sivrikaya A, Kara E, Baltaci AK, & Mogulkoc R, 2011: Effect of zinc supplementation on the distribution of various elements in the serum of diabetic rats subjected to an acute swimming exercise. *J Physiol Biochem*, 67, 511-517.
- Butola LK, Gusain N, Kute PK, Anjankar A, & Vagga AA, 2020: To study the association of vitamin D, calcium and phosphorus in type 2 diabetes mellitus patients. *Age*, 53 (11.2), 52-56.
- Bürger-Mendonça M, Bielavsky M, & Barbosa FC, 2008: Liver overload in Brazilian triathletes after half-ironman competition is related muscle fatigue. *Ann Hepatol*, 7 (3), 245-248.
- da Silva Bandeira V, Pires LV, Hashimoto LL, de Alencar LL, Almondos KGS, Lottenberg SA, & Cozzolino SMF, 2017: Association of reduced zinc status with poor glycemic control in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Trace Elem Med Biol*, 44, 132-136.
- Dhavane S, & Dhavane P, 2022: Serum magnesium level in type 2 Diabetes mellitus and its relationship with glycemic control and diabetic complications. *EJMCM*, 9 (08), 2022.
- Dönmez N, Keskin E, Özsan M, Shoshin OMA, & Mehtap B, 2020: The Favorable Effect of Swimming on Some Blood Parameters in Diabetic Rats. *Ataturk Univ Vet Bilim Derg*, 15 (1), 31-37.
- Duzguner V, & Kaya S, 2007: Effect of zinc on the lipid peroxidation and the antioxidant defense systems of the alloxan-induced diabetic rabbits. *Free Radic Biol Med*, 42 (10), 1481-1486.
- Ekperikpe US, Owolabi OJ, & Olapeju BI, 2019: Effects of Parkia biglobosa aqueous seed extract on some biochemical, haematological and histopathological parameters in streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 228, 1-10.
- Eldin AB, Diab AA, Hasan MM, Mamoud N, & Zaitoun A, 2021: Effect of vitamin D supplementation and muscular exercise on irisin serum level and related metabolic parameters in type II diabetic albino rats.
- Gagandeep D, Shailaza S, & Rahul R, 2015: Evaluation of trace elements and glycated hemoglobin in type 2 diabetes mellitus. *World J Pharm Pharm Sci*, 4 (5), 940-947.
- Gailiūnienė A, Stasiulis A, & Michailovienė J, 2007: The effect of submaximal exercise on blood creatinine, urea, total protein and uric acid levels of trained and untrained subjects. *Ugdymas. Kūno kultūra Sportas*, (3), 5-10.
- Goboza B, Aboua YG, Chegou N, & Oguntibeju OO, 2019: Vindoline effectively ameliorated diabetes-induced hepatotoxicity by docking oxidative stress, inflammation and hypertriglyceridemia in type 2 diabetes-induced male Wistar rats. *Biomed Pharmacother*, 112, 108638.
- Gómez T, Bequer L, Mollineda A, Molina JL, Álvarez A, Lavastida M, & Clapés S, 2017: Concentration of zinc, copper, iron, calcium, and magnesium in the serum, tissues, and urine of streptozotocin-induced mild diabetic rat model. *Biol Trace Elem Res*, 179, 237-246.
- Gürbüz M, & Çelik MN, 2019: Mineraller ve Diabetes Mellitus. *Türkiye Klinikleri J Intern Med*, 4 (2), 71-83.
- Hadi WH, Khudair TT, & Al-Fartosi KG, 2023: Level of lipid profile and liver enzyme of diabetic male rats induced by streptozotocin treated with forxiga. *3c Empresa: investigación y pensamiento crítico*, 12 (1), 273-288.
- Hatipoğlu D, Kahraman O, 2021: Hypoglycemic shock and acute liver injury in a dog associated with xylitol toxicity. *J VetBio Sci Tech*, 6 (2), 165-170.
- Huskinson E, Maggini S, & Ruf M, 2007: The role of vitamins and minerals in energy metabolism and well-being. *J Int Med Res*, 35 (3), 277-289.
- Jialal I, & Singh G, 2019: Management of diabetic dyslipidemia: an update. *World J Diabetes*, 10 (5), 280.
- Kalas MA, Chavez L, Leon M, Taweeseed PT, & Surani S, 2021: Abnormal liver enzymes: A review for clinicians. *World J Hepatol*, 13 (11), 1688.

- Kathak RR, Sumon AH, Molla NH, Hasan M, Miah R, Tuba HR, Habib A, & Ali N, 2022: The association between elevated lipid profile and liver enzymes: a study on Bangladeshi adults. *Sci Rep*, 12 (1), 1-8.
- Kaynar Ö, Öztürk N, Kıyıcı F, Baygutalp N, & Bakan E, 2016: The effects of short-term intensive exercise on levels of liver enzymes and serum lipids in kick boxing athletes. *Dicle Tip Derg*, 43 (1), 130-134.
- Khan AR, & Awan FR, 2014: Metals in the pathogenesis of type 2 diabetes. *JDMDC*, 13, 1-6.
- Khaoshbaten M, Gholami N, Sokhtehzari S, Monazami AH, & Nejad MR, 2013: The effect of an aerobic exercise on serum level of liver enzymes and liver echogenicity in patients with non alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 6 (Suppl 1), S112.
- Kılıçarslan G, & Dönmez N, 2016: The Effects of Quercetin on Antioxidant System and Some Blood Parameters in Experimental Diabetic Rats. *Bull Env Pharmacol Life Sci*, 5, 28-32.
- Kilincarslan G, & Donmez N, 2019: Effect of Quercetin Administration and Exercise on Plasma Cytokine Levels in Rats with STZ Induced Diabetes. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*, 8, 119-127.
- Kumar D, Priya V, Jaiprabhu J, & Ramalingam K, 2014: Serum copper and zinc levels significance in type 2 diabetic patients. *J Med Sci Tech*, 3 (2), 79-81.
- Lenaerts AJ, Johnson CM, Marrieta KS, Gruppo V, & Orme IM, 2005: Significant increases in the levels of liver enzymes in mice treated with anti-tuberculosis drugs. *Int J Antimicrob Agents*, 26 (2), 152-158.
- Lippi G, Schena F, Montagnana M, Salvagno GL, Banfi G, & Guidi GC, 2011: Significant variation of traditional markers of liver injury after a half-marathon run. *Eur J Intern Med*, 22 (5), e36-e38.
- Liu G, & Wang XH, 2014: Research advances in the effects of exercise and diet on LPL and its mechanism. *Sheng li ke xue jin zhan [Progress in physiology]*, 45 (2), 87-92.
- Makinde EA, Radenahmad N, Adekoya AE, & Olatunji OJ, 2020: Tiliacora triandra extract possesses antidiabetic effects in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Food Biochem*, 44 (6), e13239.
- Malawadi B, & Adiga U, 2016: Plasma proteins in type 2 diabetes mellitus. *J Biotechnol Biochem*, 2 (5), 1-3.
- Mohamed J, Nafizah AN, Zariyantey A, & Budin S, 2016: Mechanisms of diabetes-induced liver damage: the role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 16 (2), e132.
- Mohammad P, Esfandiari KZ, Abbas S, & Ahoora R, 2019: Effects of moderate-intensity continuous training and high-intensity interval training on serum levels of resistin, chemerin and liver enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced type-2 diabetic rats. *J Diabetes Metab Disord*, 18, 379-387.
- Mooren F, Krüger K, Völker K, Golf S, Wadepuhl M, & Kraus A, 2011: Oral magnesium supplementation reduces insulin resistance in non-diabetic subjects—a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Diabetes Obes Metab*, 13 (3), 281-284.
- O'hagan C, De Vito G, & Boreham CA, 2013: Exercise prescription in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Sports med*, 43(1), 39-49.
- Perego C, Da Dalt L, Pirillo A, Galli A, Catapano AL, & Norata GD, 2019: Cholesterol metabolism, pancreatic  $\beta$ -cell function and diabetes. *Biochim Biophys Acta mol basis dis*, 1865(9), 2149-2156.
- Pettersson J, Hindorf U, Persson P, Bengtsson T, Malmqvist U, Werkström V, & Ekelund M, 2008: Muscular exercise can cause highly pathological liver function tests in healthy men. *Br J Clin Pharmacol*, 65(2), 253-259.
- Pourvaghar MJ, & Shahsavari AR, 2010: The changes of serum magnesium on nano scale after an exhaustion exercise in male students. *Dig J Nanomater Biostructures*, 5 (1).
- Qureshi A, Jamil M, Butt MZ, Khan S, Khaskheli NA, Darya MH, Selamoglu Z, & Ozdemir B, 2022: Impact of High-Intensity Exercise on Antioxidant System and Liver Enzymes: High-Intensity Exercise, Antioxidant System & Liver Enzymes. *PBMJ*, 31-36.
- Ragbetli C, Dede S, Tanritanir P, Yoruk IH, & Ragbetli MC, 2014: Determination of micronutrients and oxidative stress status in the blood of STZ-induced experimental diabetic rat models. *Cell biochem biophys*, 70, 933-938.
- RamzanPour MR, Mousavian S, & Hejazi SM, 2014: The effect of 12 weeks of selective aerobic exercise on insulin resistance and hepatic enzymes in middle-aged type II diabetic women. *Int J Sport Stud*, 4 (5), 508-513.
- Rana S, Morya RK, Malik A, Bhadada SK, Sachdeva N, & Sharma G, 2016: A relationship between vitamin D, parathyroid hormone, calcium levels and lactose intolerance in type 2 diabetic patients and healthy subjects. *Clin Chim Acta*, 462, 174-177.
- Riaz S, Tariq M, & Aslam S, 2018: Association of serum protein levels in the diabetic patients with risk of cardiovascular disease and nephropathy in Pakistani population. *J Res Diabetes Metab*, 4 (1), 011-015.
- Sjögren M, 2007: ADVANCES IN HEPATOLOGY. *Gastroenterol Hepatol*, 3 (12), 913.
- Tangvarasittichai S, 2015: Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*, 6 (3), 456.
- Ugurlu I, Baltaci SB, Unal O, Mogulkoc R, Ucaryilmaz H, & Baltaci AK, 2022: Chronic Running Exercise Regulates Cytotoxic Cell Functions and Zinc Transporter SLC39A10/ZIP10 Levels in Diabetic Rats. *Biol trace Element Res*, 200 (2), 699-705.
- Yang W, Zhang Y, Yang J, Tan L, & Yang K, 2011: Potential antiosteoporosis effect of biodegradable magnesium implanted in STZ-induced diabetic rats. *J Biomed Mater Res Part A*, 99 (3), 386-394.
- Yao J, Meng M, Yang S, Li F, Anderson RM, Liu C, Liu L, Yuan X, Fang Z, & Lou Q, 2018: Effect of aerobic and resistance exercise on liver enzyme and blood lipids in Chinese patients with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Int J Clin Exp Med*, 11(5), 4867-4874.
- Yaribeygi H, Butler AE, & Sahebkar A, 2019: Aerobic exercise can modulate the underlying mechanisms involved in the development of diabetic complications. *J Cell Physiol*, 234(8), 12508-12515.
- Yazdi HB, Hojati V, Shiravi A, Hosseinian S, & Vaezi G, 2019: Liver dysfunction and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: protective role of *Artemisia turanica*. *J Pharmacopuncture*, 22(2), 109.



## Mikrobiyolojide En Yaygın Moleküler Tanı Yöntemi: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Oğuz Kağan TÜREDİ<sup>1,a,\*</sup>, Esra ŞEKER<sup>1,b</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-6527-8420

<sup>b</sup>ORCID: 0000-0003-0969-5286

**Geliş Tarihi:** 02.02.2023

**Kabul Tarihi:** 29.03.2023

**Bu makale Nasıl kaynak gösterilir:** Türedi OK, Şeker E.

(2023). Mikrobiyolojide En Yaygın Moleküler Tanı Yöntemi:  
Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Harran Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi Dergisi, 12(1): 118-125,  
DOI:10.31196/huvfd.1246738.

**\*Yazışma adresi:** Oğuz Kağan TÜREDİ

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye.

**e-mail:** okturedi@aku.edu.tr

Online erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Özet:** Sunulan bu derlemenin amacı diagnostik mikrobiyoloji alanında yaygın olarak kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tipleri hakkında kısa bilgi verilmesidir. İlk olarak 1985 yılında Kary Banks Mullis tarafından DNA araştırması için keşfedilen PZR, belirli bir DNA segmentinin primerler aracılığıyla enzimatik amplifikasyonunu sağlayarak çok sayıda kopyasını oluşturan *in vitro* bir yöntemdir. Günümüzde PZR ve PZR tabanlı tanı yöntemlerine ilgi giderek artmakta ve PZR, insan ve hayvanların infeksiyöz hastalıklarının tanısında ve epidemiyolojik araştırmalarda en yaygın kullanılan moleküler tanı yöntemi olarak güncelliğini korumaktadır. Sürekli güncellenen ve yeni teknikler eklenen moleküler tanı yöntemleri rutin tanıda daha ekonomik, ulaşılabilir ve uygulanabilir hale geldiğinde tanılal mikrobiyoloji alanında bu tekniklerin kullanım sıklığı ve çeşitliliği aynı oranda artacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Diagnostik mikrobiyoloji, Moleküler tanı, PZR, PZR tipleri.

### The Most Common Molecular Diagnostic Method in Microbiology: Polymerase Chain Reaction

**Abstract:** This review briefly explains Polymerase Chain Reaction (PCR) types commonly used in diagnostic microbiology. PCR, first discovered by Kary Banks Mullis in 1985 for DNA search, is an *in vitro* method involving the enzymatic amplification of a specific DNA segment by primers, creating many copies. Today, interest in PCR and PCR-based diagnostic methods is increasing, and PCR remains up-to-date as the most widely used molecular diagnostic method in the diagnosis of infectious diseases of humans and animals and epidemiological studies. When molecular diagnostic procedures are constantly updated, new techniques are added, and become more affordable, accessible, and applicable in routine diagnosis, the frequency and equality of use of these techniques in diagnostic microbiology will increase at the same rate.

**Keywords:** Diagnostic microbiology, Molecular diagnosis, PCR, PCR types.

## Giriş

Her geçen gün yeni bir tekniğin eklendiği moleküler tanı yöntemleri; infeksiyöz hastalıklara tanı konma hızını ve doğruluk oranını artıran, biyoteknolojinin mikrobiyolojik identifikasyon metodlarına sunduğu güvenilir yöntemlerdir (Gürsoy ve Otlu, 2017). Moleküler tanı yöntemlerinin başlangıcı, Francis Crick ve James Dewey Watson tarafından, daha sonraları "Watson-Crick DNA modeli" olarak bilinecek olan DNA çift sarmalının ilk açıklandığı 1953 yılına dayanmaktadır (Watson ve Crick, 1953). O dönemden 1985 yılına kadar olan süreçte biyoteknoloji alanında pek çok değerli keşif yapılmış olmakla birlikte, moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesinde en önemli dönem, oligonükleotid sentezi ve proteinler üzerine çalışmalar yapan Kary Banks Mullis tarafından 1985 yılında Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun (PZR) keşfi olarak kabul edilmektedir (Mullis, 1990; Zhu ve ark., 2020). Kary Banks Mullis'e 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü kazandıran PZR tekniğinin keşfini takiben, diagnostik mikrobiyolojide yeni bir sürece girilmiş, mikroorganizmaların fenotipik identifikasyon yöntemlerinin yerini nükleik asit amplifikasyon teknikleri almaya başlamıştır. Günümüzde pek çok alanda kullanılan PZR ve PZR tabanlı teknikler, insan ve hayvanların infeksiyöz hastalıklarının teşhisi ve epidemiyolojik araştırmalarda da en yaygın kullanılan moleküler tanı yöntemleri olarak güncelliğini korumaktadır (Şeker ve ark., 2019; Seker ve ark., 2022; Seker ve Kus, 2019; Simsek ve ark., 2021; Zhu ve ark., 2020).

Sunulan bu derlemede, diagnostik mikrobiyoloji alanında yaygın olarak kullanılan PZR tipleri hakkında kısa bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

**Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):** DNA'nın spesifik olarak tespit edilmesi amacıyla ilk kez 1985 yılında Kary Banks Mullis tarafından keşfedilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR); insan, hayvan ve bitki gibi organizmalara ait nükleik asit yapıları üzerindeki özgün bölgeleri, primerler aracılığıyla ve ısıya dayanıklı enzimler kullanılarak *in vitro* ortamlarda çoğaltılmasını sağlayan güvenilir bir moleküler tanı yöntemidir (Buckingham ve Flaws, 2007; Garibyan ve Avashia, 2013; Green ve Sambrook, 2019a; Zhu ve ark., 2020). Hedeflenen DNA veya Ribonükleik asit (RNA) dizilerinin sayısal olarak artırılması esasına dayanan PZR'nin en önemli avantajı, hedef genetik materyal çok az sayıda olsa bile DNA veya RNA dizisinin çoğaltılarak milyonlarca kopyasının çıkarılmasına ve böylece istenilen dizinin kolaylıkla identifiye edilmesine olanak tanınmasıdır (Garibyan ve Avashia, 2013; Green ve Sambrook, 2019a; Lorenz, 2012).

### Klasik PZR işleminin aşamaları

**1-Nükleik asit eldesi:** Nükleik materyallerin elde edilmesi başlarda zaman alan ve toksik, tehlikeli reaktiflerin kullanılmasını gerektiren bir işlemi. Hızlı ve güvenilir ticari ekstraksiyon kit tekniklerinin ortaya çıkmasıyla, ilk teknikler yerini büyük ölçüde tarih kitaplarına bıraktı. Artık kan, serum, tükürük, idrar, dışkı, beyin omurilik sıvısı, dokular ve hücrelerden, daha kısa sürede yüksek kaliteli nükleik materyaller elde edilebilmektedir (Price ve ark., 2009).

**2-PZR amplifikasyonu:** Döngüsel enzimatik reaksiyon esasına dayalı olan amplifikasyon işlemi, her döngüde bir

önceki döngünün amplifikasyon ürünlerini substrat olarak kullanır. Klasik bir PZR'da, reaksiyon üç basamaktan oluşur: denatürasyon, bağlanma ve uzama. Her bir döngüde bu üç aşama farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilir (Tekin ve ark., 2020).

**3-Elektroforez:** Elektroforez, elektrik alanında hareket eden yüklü molekülleri ayırmak için kullanılan bir tekniktir. Genellikle DNA, RNA veya protein gibi biyomoleküllerin ayrılması için kullanılır (Kavsaoğlu ve Mersinkaya, 2019). PZR ürünleri, agaroz jel elektroforezi veya poliakrilamid jel elektroforezi ile görüntülenebilir. Bu görüntüleme işlemi, etidyum bromid ve SYBR green gibi çeşitli boyalarla boyanarak veya radyoaktif veya nonradyoaktif maddelerle işaretlenerek gerçekleştirilebilir (Tekin ve ark., 2020).

Konvansiyonel PZR işleminde çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerini tamamlayıcı olan bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primerle sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesi esasına dayanan PZR amplifikasyonunun temel mekanizması; denatürasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension, polymerization) olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. Denatürasyon, kalıp DNA'nın 92-95 °C'de 1-2 dakika tutulması ile çift iplikçikli yapısını sağlayan hidrojen bağlarının kopması ve tek iplikçik oluşturmak üzere DNA sarmalının açılmasını ifade etmektedir. Denatürasyon süreleri değişebilir. Bu süre, DNA'nın tam olarak tek zincirli hale gelmesine yeterli olmalıdır. Ancak, bazı spesifik uygulamalar için farklı sıcaklık ve süreler gerekebilir. Bu nedenle, denatürasyon süresi konusunda genel bir kural yoktur ve kullanılacak koşullar deneysel olarak optimize edilmelidir (Buckingham ve Flaws, 2007; Green ve Sambrook, 2019a; Wang ve ark., 2014). DNA tek iplikçik haline dönüştükten sonra, oligonükleotid primerler hedef DNA'da kendilerine tamamlayıcı oldukları bölgeler ile kurulan hidrojen bağları aracılığıyla birleşirler. Primer bağlanması (annealing) olarak isimlendirilen bu basamakta en verimli sonucun alındığı bağlanma sıcaklığı genel olarak 50-65 °C arasındadır. Primer bağlanma sıcaklığını hesaplayan basit formül vardır.  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$  Bu formül, adenin-timin ve guanin-sitozin baz çiftleri arasındaki hidrojen bağı sayısının etkisini hesaba katmayan daha basit bir yaklaşımdır. Bu nedenle,  $T_m$  değeri deneysel olarak optimize edilmelidir (Kahya ve ark., 2013). Bağlanma işlemi primerin uzunluğuna ve kompozisyonuna bağlı olarak 30-60 saniyeden 5 dakikaya kadar değişebilir. Üçüncü aşama olan polimerizasyon ise, DNA'nın tek iplikçığı üzerine bağlanan primerlerin sentez için başlangıç teşkil ettiği DNA segmentinin kalan kısmının, ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi aracılığı ile çift iplikçik haline dönüştürülmesi aşamasıdır (Buckingham ve Flaws, 2007; Green ve Sambrook, 2019a; Lorenz, 2012). DNA polimeraz enzimi, 5'→3' yönünde aktivite göstererek, uygun tampon ve dört çeşit (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) varlığında primerlerin 3' hidroksil uçlarından bağlanarak DNA'nın karşıt ipliğinin uzamasını sağlar. Böylelikle, ortamdaki nükleotidleri kullanarak hedef DNA'nın kopyası oluşturur. Polimerizasyon için en uygun ısı, *Thermus aquaticus*'tan (*Taq*) elde edilen *Taq* DNA polimerazın

aktivitesini en iyi gösterdiği ısı olan 65-72 °C olup, reaksiyon süresi 2-3 dakikadır. Bu aşamada en yaygın kullanılan DNA polimeraz enzimi *Taq* DNA polimeraz olmakla birlikte, *Thermus thermophilus*'dan (*Tth*), hipertermofilik *Pyrococcus furiosus*'tan (*Pfu*), termostabil *Thermococcus gorgonarius*'tan (*Tgo*) ya da hipertermofilik *Thermotoga maritima*'dan (*Tma*, *Ultma<sup>TM</sup>*) elde edilen DNA polimerazlar da kullanılabilir (Buckingham ve Flaws, 2007; Çadircı ve ark., 2017, Kengen, 2017). Bir PZR döngüsünü oluşturan polimerizasyon aşaması (denatürasyon, primer bağlanması ve uzama) ardı ardına 25-40 kez tekrarlanarak, başlangıçtaki hedef DNA segmentinin milyonlarca kopyası elde edilmiş olur (Buckingham ve Flaws, 2007; Lorenz, 2012; Wang ve ark., 2014).

PZR'nin keşfinden bugüne, biyoteknoloji alanındaki hızlı gelişmelere bağlı olarak çok farklı PZR yöntemleri geliştirilmiştir (Green ve Sambrook, 2019a).

## 1. DNA Dizisinin Sırası Bilindiğinde Kullanılan PZR Metotları

**1.1. Konvansiyonel PZR (Conventional PCR):** Yukarıda da bahsedildiği şekilde konvansiyonel PZR, kalıp DNA, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon çözeltiler ve MgCl<sub>2</sub> gibi bileşenlerden oluşan temel PZR mekanizmasını içeren ve DNA'nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması ve zincir uzaması aşamalarının ardı ardına 25-40 kez tekrarlanması sonrası hedef DNA segmentinin çoğaltılması esasına dayanan standart PZR çeşididir (Buckingham ve Flaws, 2007; Mohammed ve ark., 2015; Porta ve Enners, 2012). Genelde tek hedef bölgenin amplifikasyonunu sağlayacak bir primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen bu PZR, monopleks PZR veya single-step PZR olarak da adlandırılır.

**1.2. Geri Transkriptaz PZR (Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR):** Reverz transkriptaz enzimi aracılığıyla hedeflenen RNA'nın tamamlayıcı DNA'ya (complementary DNA, cDNA) çevrilmesi ve tamamlayıcı DNA'nın konvansiyonel PZR ile çoğaltılması esasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem, mRNA veya viral RNA varlığı ve miktarlarının belirlenmesi ile RNA düzeyinde gen ekspresyonu çalışmalarında ve cDNA kütüphanelerinin oluşturulmasında da kullanılabilen duyarlı bir PZR tipidir (Buckingham ve Flaws, 2007; Mo ve ark., 2012).

**1.3. Multipleks (Çoklu) PZR (Multiplex PCR):** Aynı örnekte çoklu hedeflerin tek bir reaksiyon içerisinde eş zamanlı tespiti amacıyla, reaksiyon karışımına farklı hedef DNA sekanslarına spesifik birden fazla primer çiftinin ilave edilmesiyle gerçekleştirilen ve temel mekanizması konvansiyonel PZR'a çok benzeyen bir yöntemdir (Buckingham ve Flaws, 2007).

**1.4. İmmuno-PZR (Immuno-PCR, iPCR):** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve PZR tekniklerinin avantajlarını bir araya getiren ve antijen-antikor etkileşimini görselleştiren bu teknik, marker DNA'nın daha fazla amplifikasyonu ile bir DNA-antikor konjugatı kullanımı esasına dayanır. Hem antikora hem de DNA'ya bağlanabilme özelliği gösteren bağlayıcı moleküller (linker) aracılığıyla, DNA'nın spesifik olarak antijen-antikor kompleksine bağlanması ve bağlanmış DNA'nın uygun primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılması olarak tanımlanan yöntem,

ELISA gibi klasik antijen belirleme yöntemlerine göre çok daha duyarlı ve güvenilir bir antijen saptama yöntemidir (Ryazantsev ve ark., 2016).

**1.5. Yuvalanmış PZR (Nested PCR):** PZR'nin sensitivite ve spesifitesini artırmak için tasarlanmış bu teknik, iki çift amplifikasyon primeri ve iki ardışık PZR reaksiyonunun kullanımını içeren bir PZR modifikasyonudur. PZR'nin 15-30 döngülük ilk turunda bir primer seti kullanılarak, ilk amplifikasyonda hedef DNA'nın uzun bir dizisi çoğaltılır. İlk amplifikasyon sonucu elde edilen ürünlerle kalıp DNA olarak kullanılır ve ikinci primer seti kullanılarak ikinci bir amplifikasyon gerçekleştirilir ve ilk amplifikasyon ürünü olan DNA'nın küçük bir bölgesi çoğaltılır (Hirschhorn ve ark., 2022). İlk primer seti hedef DNA'nın dış ve büyük bölgesine bağlanırken, ikinci primer seti hedef DNA'dan üretilen ürün DNA'nın iç kısmına bağlanır (Carr ve ark., 2010). Bu uygulamada çoğaltılması istenen hedef DNA'nın, konvansiyonel PZR sonucu elde edilen DNA'dan 10<sup>4</sup> kat daha hassas olduğu, böylece istenmeyen dizi elde edilme durumunun ortadan kalktığı belirtilmektedir (Sevindik, 2013).

**1.6. Sıcak başlangıçlı PZR (Hot-start PCR):** Bu yöntem, PZR'nin ilk aşamalarında oda ısı veya daha düşük sıcaklıklarda spesifik olmayan DNA amplifikasyonu nedeniyle oluşacak istenmeyen ürünlerin ve primer dimerlerin varlığını azaltan, konvansiyonel PZR'nin modifiye edilmiş bir şeklidir. Spesifik olmayan bağlanmaları önlemek ve PZR'de verim kaybını en aza indirmek için, *Taq* DNA polimerazın inaktivasyonu veya bağlanmasının inhibe edilmesi ve *Taq* polimerazın reaksiyona geç eklenmesi gibi ek ısıtma ve separasyon yöntemleri kullanılır. Reaksiyon karışımlarının yüksek sıcaklıklarda tamamlanmasının sağlanması için düşük sıcaklıklarda *Taq* DNA polimeraz aktivitesini bloke eden modifikasyonlar, modifiye edilmiş dNTP'lerin kullanımını veya temel reaktiflerden birinin denatürasyondan sonra eklenmesi gibi uygulamalar tercih edilir. Bu ek uygulamalar, reaksiyon karışımındaki spesifik enzimlerin optimal bağlanma sıcaklığına ulaşılan kadar inaktif kalmasını veya inhibe edilmesini sağlar (Hirschhorn ve ark., 2022).

**1.7. Kademeli Sıcaklık Düşürme PZR (Touchdown PCR):** PZR'de sıkça karşılaşılan sorunlardan biri, düşük sıcaklıklarda primerlerin daha az spesifik olarak bağlanması ve non-spesifik bant görüntüsü ile PZR sonuçlarını yanıltmasıdır. Bu sorunun çözümü amacıyla geliştirilen bu teknikte, primerlerin bağlanması aşaması için seçilen sıcaklık başlangıçta primerlerin hesaplanan erime sıcaklığı (*T<sub>m</sub>*) değerinden 5°C-10°C daha yükseğe ayarlanır ve bu koşullar altında mükemmel primer-kalıp hibritlerinin oluşumu sağlanır. Sonraki döngülerde yani PZR'nin sonlarına bağlanma sıcaklığı, primerler için hesaplanan *T<sub>m</sub>* değerinin 2°C-5°C altında olacak şekilde kademeli olarak düşürülür. Buradaki amaç, PZR sonuna kadar hedef dizinin birkaç geometrik amplifikasyon döngüsünden geçecek olması ve bu nedenle PZR'nin baskın ürünü haline gelecek olmasıdır. PZR'nin erken aşamalarında karşılaşılabilecek hataları en aza indirmek için bu yöntemin her zaman bir sıcak başlatma protokolü ile birlikte gerçekleştirilmesi önerilmektedir (Green ve Sambrook, 2018).

**1.8. Kolorimetrik PZR (Colorimetric PCR):** Kolorimetrik PZR'da, belirli bir DNA dizisi çoğaltılır ve sonuçta oluşan ürünler bir renk ölçütü ile tespit edilir. Bu yeni yaklaşım RT-PZR'nin spesifitesini ve ELISA'nın kullanım kolaylığını bir araya getirmektedir. Reaksiyonda heminin bağlanması üzerine peroksidazın katalitik aktivitesini taklit eden DNAzimler gibi biyokatalizörlerin kullanıldığı ve bu biyokatalizörler tarafından oluşturulan kolorimetrik tepkimelerin ölçüldüğü bir PZR yöntemidir. PZR hedef DNA dizisini çoğalttıkça, boya maddesi çoğaltılmış DNA'ya bağlanır ve DNA'nın çoğaltılmış miktarına bağlı olarak renk değişir. Hedef genin çoğaltıldığı, reaksiyon tüplerindeki renk değişikliği ile anlaşılır (Seok ve ark., 2014).

**1.9. Dijital PZR (Digital PCR, dPCR):** Üçüncü nesil PZR olarak da tanımlanan dijital PZR, DNA veya RNA moleküllerinin, rastgele çok sayıda küçük hacimli bölmelere (nanometre hassasiyetinde) ayrıldığı ve amplifikasyon sonrasında her bölmedeki moleküllere ait absorbansın hesaplandığı bir yöntemdir (Mao ve ark., 2019). Konvansiyonel PZR'nin biyoteknolojik olarak iyileştirilmiş ve geliştirilmiş şekli olan dijital PZR ile konvansiyonel PZR arasındaki temel fark, nükleik asit miktarlarını ölçme yönteminde yatmaktadır. Dijital PZR daha fazla sayıda kopyası oluşması nedeniyle daha yüksek spesifite ve sensitiviteye sahiptir (Perkel, 2015). Bitki patojenleri, genetiği değiştirilmiş organizmalar, dirençli bakteriler, virüsler, nadir görülen mutasyonların tespitinde ve yeni nesil dizileme analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Pavšič ve ark., 2016).

**1.10. Gerçek zamanlı PZR (Real-Time PCR) veya Kantitatif PZR (Quantitative PCR, qPCR):** Bu teknik, PZR ile çoğaltılan DNA parçalarının çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli problar ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı, amplikon konsantrasyonundaki değişiklikleri gerçek zamanlı olarak algılayabilen ve tespit edebilen PZR tabanlı bir tekniktir (Kralik ve Ricchi, 2017). Test, birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boyu farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile ayrılan ve farklılık gösteren Real-Time PZR cihazlarında gerçekleştirilir. Real-Time PZR temelde; spesifik olmayan çift iplikçikli DNA'nın çoğaltılmasında kullanılan "SYBR Green I" tabanlı qPCR ve spesifik DNA bölgesinin çoğaltılması ve saptanmasında floresan işaretli probların kullanıldığı "TaqMan®" tabanlı qPCR olarak ikiye ayrılır. SYBR Green I yönteminde reaksiyonun başında reaksiyon karışımında çift iplikçikli DNA, primerler ve SYBR Green I floresan boyası bulunur. Primerler bağlanıp uzama başladığında SYBR Green I boyası çift iplikçikli DNA'ya bağlanır ve floresan yayılım başlar. DNA miktarındaki artışa paralel olarak, yayılan floresan sinyalin Real-Time PZR cihazı monitöründe okunan miktarı da eş zamanlı olarak artar. TaqMan® prob yönteminde ise, çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve 5' ucu "fluorophore (6-karboksifloresin, 6-FAM)" ve 3' ucu "quencher (6-karboksitetrametil-rodamin, TAMRA)" floresan boya ile işaretlenmiş tek zincirli bir prob kullanılır. Amplifikasyon sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primer bağlanma bölgeleri arasına TaqMan® problar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar ve probun bağlı olduğu bölgeye

ulaşıldığında Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün artışı oldukça, floresan da ona paralel olarak artmaya devam eder (Cao ve Shockey, 2012; Kralik ve Ricchi, 2017).

**1.11. In situ PZR (In situ PCR):** In situ PZR, lam üzerine fikze edilmiş hücre, doku veya doku parçalarındaki hedef DNA veya RNA'nın kolorimetri veya floresan kullanılarak belirlenmesinde kullanılan semikantitatif bir yöntemdir. Dokulardaki veya tek hücrelerdeki transkript seviyelerinin kesin olarak ölçümünde, in situ PZR'nin RT-PZR gibi kantitatif bir transkript saptama tekniği ile birlikte kullanılması gerekmektedir (Bagasra, 2007).

**1.12. COLD-PZR (COLD-PCR):** COLD-PZR'nin temel prensibi her DNA dizisi için, bu dizilerin kendine özgü  $T_m$  değerinden daha düşük olan kritik bir denatürasyon sıcaklığına dayanır. Düşük denatürasyon sıcaklığına dayalı bu teknik, mutasyon tipi ve konumundan bağımsız olarak hem bilinen hem de bilinmeyen azınlık alellerin birlikte amplifikasyonu ile sonuçlanan tek adımlı bir amplifikasyon yöntemidir (Li ve Makrigiorgos, 2009; Phung ve ark., 2020). COLD-PZR; düşük düzeydeki somatik DNA mutasyonlarının belirlenmesinde ve mutasyon içeren bir DNA karışımından DNA parçalarının çoğaltılmasında yaygın kullanım alanına sahiptir (Li ve Makrigiorgos, 2009).

## 2. DNA Dizisi Bilinmediğinde Kullanılan PZR Metotları

**2.1. Polimorfik DNA'nın Rastgele Çoğaltılması (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD-PCR):** RAPD-PCR; ilgili türün genomik DNA'sının, 9-10 nükleotidli rastgele seçilmiş tek primer eşliğinde ve düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak çoğaltılması esasına dayanır. Bu tekniğin konvansiyonel PZR'den en önemli farkı, hedef organizmanın DNA dizisi hakkında herhangi bir spesifik bilgi gerektirmeksizin polimorfizmin belirlenmesini sağlamaktır (Buckingham ve Flaws, 2007; Öz Aydın, 2004). RAPD-PCR, prokaryotik ve ökaryotiklerin taksonomisinde, genetik çeşitlilik çalışmalarında, genom yapısının araştırılmasında, evrimsel sorunların çözülmesinde, ebeveyn belirlemede, genetik varyasyonun belirlenmesinde, bağlantı haritalarının oluşturulmasında, özgün bir gen lokusunun belirlenmesinde, adli tıpta, klinik tanı ve epidemiyoloji gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Öz Aydın, 2004).

**2.2. Asimetrik PZR (Asymmetric PCR):** Asimetrik PZR; sekanslama ve hibridizasyon problemlerinin kullanımını gerektiren durumlarda, DNA'nın çift sarmalından sadece birinin amplifikasyonu sağlayan bir PZR tekniğidir. Hedeflenen DNA sarmalının sentezini desteklemek için molariteleri eşit olmayan primerlerin eklenmesi dışında, tüm işlem konvansiyonel PZR'ye benzerlik gösterir. Bu teknikte, reaksiyonda kullanılacak primerlerden biri miktarca diğerinden yüksek tutularak, çoğunlukla o primerin bağlanacağı bölgenin çoğaltılması sağlanır (Nehdi ve ark., 2020; Sanchez ve ark., 2004).

**2.3. Üstel Sonrası Doğrusal PZR (Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR):** LATE-PCR; Real-Time PZR temelli bir amplifikasyon tekniğidir. Asimetrik PZR araştırmacılar tarafından optimizasyonu zor ve verimsiz olduğu

düşünüldüğü için LATE-PZR tekniği geliştirilmiştir. Asimetrik PZR tekniğinde, bir primerin konsantrasyonunun sınırlandırılması, erime sıcaklığını reaksiyon sıcaklığından daha düşük bir seviyeye çekerek verimi azaltabilir. Bu nedenle, bu yöntemde primerlerin optimize edilmesi oldukça zordur. Ancak, LATE-PZR, yeni bir primer tasarımı modeli sunarak, primer oranından bağımsız olarak simetrik PZR deneyleri kadar verimli deneyler yapabilmeye imkân sağlar. Bu teknik, primerlerin belirli bir bölgesinin erken aşamalarında hedefe özgü olmasını sağlayarak, asimetrik PZR'ye göre daha verimli ve öngörülebilir bir amplifikasyon grafiği oluşturur. Bu sayede, primerlerin konsantrasyon oranları ile uğraşmadan, daha az optimize edilmiş primerlerle bile yüksek verim elde etmek mümkündür. LATE-PZR yönteminin, özellikle az miktardaki numunelerdeki hedef sayıların gerçek zamanlı kantitatif analizi için kullanışlı bir teknik olduğu, klinik teşhis, biyosavunma, adli tıp ve DNA dizileme gibi alanlar için verimliliği yüksek uygulamalara uyarlanabileceği vurgulanmaktadır (Pierce ve Wangh 2007; Sanchez ve ark., 2004).

**2.4. Demirlenmiş PZR (Anchored PCR, A-PCR):** Hedef DNA'nın yalnızca bir ucundaki nükleotid sekansının bilindiği çift iplikçikli DNA fragmentlerine uygulanan, proteinin yalnızca N-terminal sekansı bilindiğinde bir genin tam sekans amplifikasyonuna izin veren bir PZR modifikasyonudur. Tekniğin amacı, bilinen sekans bölgesinden yararlanılarak hedeflenen DNA sekansının amplifikasyonudur. Amplifiye edilecek DNA sekansı, bilinen bir diziyeye bağlanır ve bilinen dizi reaksiyonda ikinci primer olarak kullanılır (Zheng ve ark., 2014).

**2.5. Ters PZR (Inverse PCR, Inverted PCR, IPCR, Inside-out PCR):** Ters PZR, bilinen bir DNA dizisinde yakın olarak bulunan ve bilinmeyen bazlara sahip olan DNA segmentlerinin amplifikasyonunu amaçlayan bir PZR yöntemidir. Bilinmeyen DNA bölgesinin yakınındaki bilinen konumu tanımlayarak, bilinen DNA bölgesini tamamlayıcı primerlerin tasarlanması, bilinmeyen bölgenin amplifiye edilmesine yardımcı olur. Bu yöntemde, önce bilinen DNA sekansı ve onun yan bölgesindeki baz sıraları bilinmeyen segmentler bir restriksiyon enzimi ile lineer olarak kesilir. Ardından restriksiyon fragmentleri ligasyonla sirküler hale dönüştürülür. Tekrar kesilerek lineer forma dönüştürülür. İki ucunda baz sıraları bilinen sekanslar, ortada ise bilinmeyen sekanslara sahip DNA segmenti tekrar restriksiyon enzimi ile lineer olarak kesilir. Bilinen sekanslara komplementer olarak tasarlanmış iki ayrı primer yardımı ile amplifikasyon gerçekleştirilir (Green ve Sambrook, 2019b).

### 3. PZR Sonrası Genotiplendirme ve Sekans Analiz Yöntemleri

**3.1. Genotiplendirme Yöntemleri:** PZR sonrası amplifiye edilmiş DNA ürünlerinin genotiplendirmesi için birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler; Elektroferez, Restriksiyon Fraksiyon Uzunluğu Polimorfizmi, Tek nükleotid Polimorfizmi, Allel Spesifik PZR, Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) Analizi gibi benzer veya küçük farklılıkları bulunan yöntemler geliştirilmiştir.

**3.1.1. Jel Elektroferez Yöntemi:** Jel elektroferez yöntemi; DNA, RNA veya protein gibi makromoleküllerin boyutlarına ve elektriksel yüklerine göre ayrılması ve analizi

için kullanılan bir yöntemdir. DNA jel elektroferez işlemi, çoğu zaman DNA'nın PZR ile çoğaltılmasından sonra yapılır. Ayrıca; kütle spektrometresi, DNA sekans analizi, blotlama tekniklerinde, özellikle de southern blotlama tekniğinde kullanılır. Moleküler teknikler bakımından en çok kullanılanı darbeli alan jel elektroferezidir (Drabik ve ark., 2016).

**3.1.2. Restriksiyon fraksiyon uzunluğu polimorfizmi (RFLP) Yöntemi:** RFLP tekniğinin ilk olarak bitkilerde, DNA dizilerindeki varyasyonları incelemek için kullanılan başarılı bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntemde, bir organizmanın DNA'sı belirli restriksiyon enzimleri ile kesilir ve kesilen parçalar jel elektroferezini kullanılarak boyutlarına göre ayrıştırılır. Bu parçalar, farklı uzunluklarda olabilir ve farklı organizmalar arasında değişebilir. Bu nedenle DNA'daki genetik farklılıkların tespitinde kullanılabilirler. RFLP teknikleri doğası gereği zorlayıcı, zahmetli ve zaman alıcı olmasından dolayı yerini daha az karmaşık, daha uygun maliyetli PZR tabanlı tekniklere bırakmıştır. Çeşitli PZR tabanlı teknikler arasında; basit dizi tekrarları (Single sequence repeat, SSR), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA'lar (RAPD), dizisi karakterize edilmiş çoğaltılmış bölge (Sequence Characterized Amplified Region, SCAR), bölünmüş çoğaltılmış polimorfik DNA'lar gibi çeşitli belirteçler, çoğaltılmış fraksiyon uzunluğu polimorfizmleri (AFLPs) ve SSR'ler arası (ISSR) analizi gibi benzer birçok yöntem geliştirilmiştir (Bhatia ve ark., 2013; Deschamps ve ark., 2012).

**3.1.3. Tek nükleotid Polimorfizmi (Single nucleotide polymorphisms, SNP) Yöntemi:** Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP), DNA dizisinde bir nükleotidin diğer bir nükleotid ile değiştirilmesi sonucu oluşan en küçük genetik varyasyon türüdür. İnsan genomunun yanı sıra diğer organizmaların genomlarında da en yaygın genetik varyasyon türüdür. SNP'ler, genetik materyalin genomik varyasyonlarını oluşturur ve bireyler arasındaki genetik farklılıkların ana nedenlerinden biridir. SNP'ler, hem kodlayıcı hem de kodlamayan bölgelerde ortaya çıkabilir ve gen ekspresyonu, protein fonksiyonu ve hastalık duyarlılığı gibi birçok biyolojik işlevi etkileyebilir. SNP'ler, genetik ilişki çalışmalarında genetik işaretleyiciler olarak kullanılabilir ve özellikle karmaşık hastalıkların genetik temellerinin anlaşılmasında önemli bir araçtır. SNP'ler, yüksek hızlı DNA dizileme, mikroarrayler, PZR tabanlı yöntemler gibi çeşitli teknikler kullanılarak tespit edilebilir. SNP analizi, genomik çalışmaların yanı sıra, kişiselleştirilmiş tıp, farmakogenetik ve araştırma alanlarındaki diğer birçok uygulamada da yaygın olarak kullanılmaktadır. Genomdaki frekanslarının uygun maliyetli ve paralel bir şekilde belirlenmesindeki göreceli kolaylığı nedeniyle en yaygın kullanılan genotiplendirme yöntemi olarak ortaya çıkmıştır (Deschamps ve ark., 2012).

**3.1.4. Allel Spesifik PZR (AS-PCR) Yöntemi:** Allel özgü polimeraz zincir reaksiyonu (AS-PCR), PZR ürünlerinin etidyum bromür boyalı agaroz veya poliakrilamid jelde analiz edilmesiyle insan DNA'sındaki herhangi bir nokta mutasyonunun doğrudan tespit edilmesine izin veren bir PZR uygulamasıdır. AS-PCR, DNA şablonu ile uyumsuzluk oluşturan bir oligonükleotid primerin Taq DNA polimeraz tarafından primer uzatmasına dirençli olacağı için çalışır. Bu nedenle, bilinen tüm alellere özgü oligonükleotid primerler



sentezlenebilir ve bilinmeyen genotipteki DNA'lardaki alelleri tespit etmek için kullanılabilir. AS-PCR, genetik ve bulaşıcı hastalıkların teşhisini içeren DNA tabanlı teşhis tekniklerinde kullanılmaktadır (Ugozzoli ve Wallace, 1991).

**3.1. 5. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (High Resolution Melting Analysis, HRM):** Klinik uygulamalar için ilk olarak Carl Wittwer ve ark. (1997) tarafından tanımlanan yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizi, Real-Time PZR yönteminin uygulamaya girmesiyle geliştirilmiş otomatize bir yöntemdir. PZR işleminden sonra Real-Time PZR cihazında aynı tüpte otomatize ve programlamayla takip eden bir prosedüre sahip HRM yönteminde, verilerin elde edilmesi Real-Time PZR'den sonra 10-15 dakika içinde gerçekleşebilmekte ve bu veriler 2 saniyedeki 0,1-1 °C sıcaklık artışına karşılık oluşan floresan sinyal şiddeti değişiminin ölçülmesiyle elde edilmektedir. İlgili DNA bölgesinin Real-Time PZR ile çoğaltılmasını takiben, Real-Time PZR işleminde artan sıcaklık ve azalan floresan boya miktarına bağlı olarak, HRM eğrileri adı verilen sigmoidal erime eğrileri oluşturulur. HRM, erime sıcaklıklarındaki farklılıklara dayalı olarak diziler arasındaki ince farkları algılayabilen, Real-Time PZR sonuçlarını analiz etmek için verimli, doğru ve hızlı bir tekniktir. Mikrobiyal genotiplendirme amacıyla kullanılan birçok yöntem olmasına karşın, HRM yöntemi var olan yöntemlere kıyasla daha hızlı ve kolay analiz olanağı sağlamaktadır. HRM eğrileri analiz edilerek; tür tanımlama, hedef dizideki tek nükleotid polimorfizmi (SNP) farkları, nokta mutasyonlar, spesifik genotiplerin özellikleri dahil olmak üzere nükleik asit dizilerindeki genetik varyasyonların belirlenmesi mümkündür. Ayrıca, HRM teknolojisi bakteri, virus ve parazitlerdeki direnç gelişiminden sorumlu spesifik mutasyonların analizi için de önemli bir yöntemdir. Bununla birlikte, özellikle tür, örnek sayısı ve filogenetik yakınlık arttıkça sınıflandırma sürecinin zorlaştığı bildirilmiştir (Erali ve ark., 2008; Ozkok ve Celik, 2022; Zhou ve ark., 2022).

**3.2. Sekans Analizi:** Watson ve Crick'in 1953'te DNA'nın üç boyutlu yapısını keşfetmeleriyle birlikte, DNA replikasyon işlemlerinin ve nükleik asitleri kodlayan proteinlerin keşifleri başladı. Ancak protein zincirlerinin sırasını anlamak için geliştirilen stratejiler, DNA molekülünün çok daha uzun ve birbirine daha çok benzeyen, ayırt etmeyi zorlaştıran daha az birimden oluşması nedeniyle nükleik asit araştırmalarına kolayca uygulanabilecek gibi görünmüyordu. Bu yüzden ilk sekans uygulamalarında daha saf olarak bulunan tek zincirli RNA üzerine odaklanıldı. Robert Holley ve meslektaşları 1965 yılında *Saccharomyces cerevisiae*'den ilk tam nükleik asit dizisini çoğaltmayı başardılar. Daha sonra Frederick Sanger ve arkadaşları, DNA dizisinin sekansını belirleyen bir teknik geliştirdiler (Heather ve Chain, 2016).

DNA dizileme, DNA molekülündeki nükleotitlerin (A, T, C, G) kompozisyonunu ve diziliş sırasını belirleme olarak tanımlanmaktadır. Temelde biri klasik zincir sonlandırma yöntemine dayanan Maxam-Gilbert ve Sanger sekanslama metodu, diğeri ise çok sayıda DNA molekülünü hızlı bir şekilde işleyebilen Yeni Nesil Sekanslama (Next Generation Sequencing, NGS) yöntemi olmak üzere iki ana DNA dizileme yöntemi bulunmaktadır.

**3.2.1. Sanger Sekanslama:** Zincir sonlandırma dizileme yöntemi olarak da bilinen Sanger sekanslama, Sanger ve ark. (1977) tarafından geliştirilmiş, günümüzde de yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu teknikte amaç, DNA fragmanlarının jel üzerindeki uzunluklarının dikkate alınarak DNA molekülünün baz kompozisyonunu ve dizilişini ortaya çıkarmaktır. Sanger metodunda, tek iplikçikli kalıp DNA, serbest OH grubu içeren tek yönlü primer, DNA polimeraz, DNA zincirlerinin monomerleri olan deoksiribonükleotit trifosfatlar (dNTPs) ve dideoksiribonükleotit trifosfatlar (ddNTPs) kullanılır. Bu yöntemde, kalıp DNA'ya tamamlayıcı bir DNA primeri, DNA sentezi için bir başlangıç noktası olarak kullanılır. Dört dNTP varlığında, polimeraz enzimi, kalıp DNA zincirine tamamlayıcı dNTP'yi ekleyerek primeri uzatır. Nükleotit zincirine hangi nükleotidin dahil edildiğini belirlemek için, sentez reaksiyonunu sonlandırmada farklı bir floresan boya ya da radyoaktif ile işaretlenmiş dört ddNTP kullanılır. Bu ddNTP'ler, dNTP'lerle kıyaslandığında DNA zincirlerinin uzatılması için gerekli olan 3' hidroksil grubundan yoksundur ve bu nedenle bir sonraki dNTP'nin 5' fosfatı ile bir bağlantı oluşturamaz ve sonuçta zincir sonlandırıcı olarak görev yaparlar. Reaksiyon dört ayrı tüpte gerçekleştirilir. Her bir tüpte dNTP'lerin tamamı, çok düşük konsantrasyonda da farklı bir ddNTP kullanılır. Her tüpte gerçekleşen PZR reaksiyonunda kullanılan dNTP'ler eklenip reaksiyon devam ederken, 3' hidroksil grubundan yoksun olan ddNTP'ler zincire eklendiğinde reaksiyon durur. Bu ddNTP'lerin bağlandığı farklı konumlarda reaksiyon sonlandığı için farklı uzunluklarda DNA fragmanları oluşur. PZR sonrasında oluşan reaksiyon ürünleri jel elektroforezinde görüntülenir (Heather ve Chain, 2016). Nükleotid dizisi belirleme işlemi, jel elektroforez sonrası daha küçük olan parçaların daha uzun mesafeler kat ettiği prensibine dayanır. Sanger yöntemi otomatize edildikten sonra yaklaşık 30 yıl boyunca altın standart olarak kabul edilerek kullanılmıştır. İlk nesil DNA dizileme cihazları, biraz daha kısa dizileme okumaları yapabilen 1 kilobazdan (kb) daha küçük parçaları dizileme kapasitesine sahiptir. Daha uzun bölgelerin dizilenmesi için ise İnsan Genom Projesi'nde kullanılan "shotgun dizileme" yöntemi kullanılır. Bu yöntemde öncelikle hedeflenen bölge parçalara ayrılır ve dizileme sonrasında bu parçalar bir araya getirilerek bütün bir DNA dizisi oluşturulur (Darcan ve Türkyılmaz, 2018).

**3.2.2. Maxam-Gilbert Sekanslama:** Maxam ve Gilbert tarafından; Sanger sekanslama yöntemiyle aynı yıl geliştirilen bir DNA dizileme yöntemidir. DNA'nın kimyasal modifikasyonuna dayanır ve belirli baz dizilerinden kesilerek daha sonra toplanır. Bu yöntemde, bir dizileme jelinden kırk klon analiz edilebilir. Ancak, tehlikeli kimyasallar kullanılabildiği için Sanger yöntemine göre daha az tercih edilen ve daha yavaş bir yöntemdir. Maxam-Gilbert ve Sanger yöntemleri birinci nesil dizileme olarak adlandırılır. Son 20 yılda birçok insan, hayvan ve bitki genomu çalışmasında kullanılmıştır. Bu yöntemlerin zahmetli olması ve ideal DNA dizileme teknolojisi gereksinimleri nedeniyle, yeni nesil dizileme yöntemleri geliştirilmiştir (Kekeç ve ark., 2022).

**3.2.3. Yeni Nesil Sekanslama (Next Generation Sequencing, NGS):** İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla birlikte DNA dizileme alanında birçok platform geliştirilmiştir.

Yeni Nesil Sekanslama, milyonlarca örneği farklı platformlar kullanarak aynı anda sekanslamak için kullanılan tekniklere verilen bir isimdir. Yeni Nesil Sekanslama yöntemleri, diğer analiz yöntemlerinde fark edilemeyecek düzeydeki mutasyonları tespit edebilmesi nedeniyle sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Yeni Nesil Sekanslama'da birbirinden farklı ve çeşitli platformlar kullanılsa da akış şeması temelde ilk olarak bir kütüphane hazırlanması, ardından sekanslama yapılması ve son olarak da elde edilen verilerin çeşitli biyoinformatik yöntemlerle analiz edilmesi olmak üzere üç ana kısımdan oluşmaktadır. Teknolojinin ilerlemesiyle her biri kendi yeni yöntemlerini barındıran, avantajları ve dezavantajları bulunan Yeni Nesil Sekanslama platformları ortaya çıkmaktadır. Sekanslama yöntemi kullanılan platforma göre değişiklik göstermekle beraber, güncel olarak en çok tercih edilen platformlara örnek olarak Roche 454, Solexa, Illumina, Pirosekanslama, İyon Yarı İletken dizileme ve SOLID (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) verilebilir (Heather ve Chain, 2016, Luo ve ark., 2012; Patrinos ve ark., 2016). Son nesil sekans yöntemlerinden; elektrik akışını kullanarak sekansları belirleyen yeni geliştirilen Nanopore sekans teknolojisi, klasik florasan okumalara alternatif bir seçenek sunar. Nanoporeler, her bir bazın elektrik yükünü belirlemek ve sekansı kaydederek belirlemek için kullanılır. Bu sayede, Nanopore sekanslama yöntemiyle daha uzun sekanslar okunabilmektedir (Wang ve ark., 2021).

## Sonuç

Mikrobiyoloji alanında kullanılan geleneksel teşhis yöntemleri, yavaş üreyen ve teşhisi uzun zaman alan infeksiyöz etkenlerin ya da doğal konaklarının dışında üretilmesi çok zor olan ve bu nedenle izole edilemeyen infeksiyöz ajanların tanısı gibi durumlarda sınırlı bir kullanım alanına sahip olabilmektedir. Bunun yanı sıra, optimizasyonunun zaman alması, optimizasyon için uzmanlaşmış deneyimli personele ihtiyaç duyulması, sarf malzeme, alet ve ekipmanlarının pahalı olması gibi dezavantajlarına rağmen günümüzde PZR ve PZR tabanlı diagnostik teşhis yöntemlerine ilgi giderek artmakta ve PZR, insan ve hayvanların infeksiyöz hastalıklarının teşhisi ve epidemiyolojik araştırmalarda da en yaygın kullanılan moleküler tanı yöntemi olarak güncelliğini korumaktadır. Sürekli olarak güncellenen ve yeni tekniklerin eklendiği moleküler tanı yöntemleri daha ekonomik, daha ulaşılabilir ve rutin teşhiste daha uygulanabilir olduğunda, bu tekniklerin diagnostik mikrobiyoloji alanında kullanım sıklığı ve çeşitliliği de aynı oranda artacaktır.

## Çıkar çatışması

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

## Benzerlik Oranı

Makalenin benzerlik oranının, sisteme yüklenen raporda belirtildiği gibi % 12 olduğunu beyan ederiz.

## Etik izin

Bu çalışma "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esasları Hakkında Yönetmelik" Madde 8(k) uyarınca HADYEK'in iznine tabi değildir.

## Açıklama

Bu derleme, Oğuz Kağan TÜREDİ'nin doktora seminerinden özetlenmiştir.

## Yazar Katkıları

Fikir/İçerik: OKT, EŞ  
Tasarım: OKT, EŞ  
Kontrol/Danışmanlık: EŞ, OKT  
Veri Toplama ve/veya İşleme: OKT, EŞ  
Analiz ve/veya Yorum: OKT, EŞ  
Kaynak Taraması: OKT, EŞ  
Yazım: OKT, EŞ  
Eleştirel İnceleme: EŞ, OKT

## Kaynaklar

- Bagasra O, 2007: Protocols for the *in situ* PCR-amplification and detection of mRNA and DNA sequences. *Nat Protoc*, 2 (11), 2782-2795.
- Bhatia D, Wing RA, Singh K, 2013: Genotyping by sequencing, its implications and benefits. *Crop Improv*, 40 (6), 101-111.
- Buckingham L, Flaws ML, 2007: Molecular Diagnostics Fundamentals, Methods, & Clinical Applications. FA Davis Company., Philadelphia, USA.
- Cao H, Shockey JM, 2012: Comparison of TaqMan and SYBR green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. *J Agric Food Chem*, 60 (50), 12296-12303.
- Carr J, Williams DG, Hayden RT 2010: Molecular detection of multiple respiratory viruses. In: *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory* (First Ed), Wayne WG (Ed), 289-300, Academic Press, Elsevier Inc, USA.
- Çadircı BH, Bebek O, Çam D, 2017: Thermococcus gorgonius DNA polimerazının rekombinant olarak üretimi. *Selçuk Üniv Fen Fak Fen Derg* 43 (1), 1-9.
- Darcan C, Türkyılmaz O, 2018: Yeni Nesil Dizileme Teknolojisine Genel Bakış. *Bilecik Şeyh Edebali Üniv Fen Bilim Derg*, 5 (1), 41-49.
- Deschamps S, Llaca V, May GD, 2012: Genotyping by Sequencing in Plants. *Biology*, 1 (3), 460-483.
- Drabik A, Bodzon-Kulakowska A, Silberring J, 2016: Gel Electrophoresis. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, (Second Edition), 165-167, Academic Press, Elsevier Inc, USA.
- Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT, 2008: High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol*, 85 (1), 50-58.
- Gariyban L, Avashia N, 2013: Research techniques made simple: Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*, 133 (3), 1-4.
- Green MR, Sambrook J, 2018: Touchdown polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protoc*, 2018 (5), 350-353.
- Green MR, Sambrook J, 2019a: Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Protoc*, 436-456.
- Green MR, Sambrook J, 2019b: Inverse polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*, 2019 (2).

- Gürsoy NC, Otlu B, 2017: Mikrobiyota çalışmalarında moleküler tanı yöntemleri. *J Biotechnol and Strategic Health Res*, 1 (Special issue), 56–67.
- Heather JM, Chain B. 2016: The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107 (1), 1-8.
- Hirschhorn JW, Schandl CA, Nolte FS, 2022: Polymerase chain reaction and other nucleic acid amplification technology. In: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, McPherson RA, Pincus MR (Ed), 1387-1400, Elsevier Inc, USA.
- Kahya S, Buyukcangaz E, Carlı KT, 2013: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. *Uludag Univ J Fac Vet Med*, 32 (1), 31-38.
- Kavsaoglu AR, Mersinkaya İ, 2019: Python ile Mini Jel Elektroforez Kontrol Yazılımı ve Sistem Tasarımı. *GU J Sci Part C*, 7 (4), 969-984.
- Kekeç I, Sipahi N, İkiz S, 2022: New generation genome sequencing methods. *J Surg Med*, 6 (4), 503-506.
- Kengen SWM, 2017: *Pyrococcus furiosus*, 30 years on. *Microb Biotechnol*, 10 (6), 1441-1444.
- Kralik P, Ricchi M, 2017: A basic guide to Real Time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol*, 8, 108.
- Li J, Makrigiorgos GM, 2009: COLD-PCR: A new platform for highly improved mutation detection in cancer and genetic testing. *Biochem Soc Trans*, 37 (Pt 2): 427-432.
- Lorenz TC, 2012: Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*, (63): 1–15.
- Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Konstantinidis KT. 2012: Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One*, 7 (2), 7 (3), e30087.
- Mao X, Liu C, Tong H, Chen Y, Liu K, 2019: Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *Am J Transl Res*, 11 (12), 7209-7222.
- Mo Y, Wan R, Zhang Q, 2012: Application of reverse transcription-PCR and real-time PCR in nanotoxicity research. *Methods Mol Biol*, 926, 99-112.
- Mohammed S, Birhan G, Admassu B, Shite A, Yeneneh H, 2015: Review on polymerase chain reaction and its diagnostic merit over conventional techniques in animal disease. *Int J Basic Appl Sci*, 7 (5), 262-281.
- Mullis KB, 1990: The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, 262 (4), 56-65.
- Nehdi A, Samman N, Aguilar-Sánchez V, Farah A, Yurdusev E, Boudjelal M, Perreault J, 2020: Novel strategies to optimize the amplification of single-stranded DNA. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 401.
- Öz Aydın S, 2004: RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematiği. *Journal of Scientific Reports-A*, 6, 113-130.
- Patrinou GP, Danielson PB, Ansorge WJ, 2016: Molecular Diagnostics: Past, Present, and Future. In *Molecular Diagnostics: Third Edition*. Elsevier Ltd. Amsterdam, NL.
- Pavšič J, Žel J, Milavec M, 2016: Assessment of the real-time PCR and different digital PCR platforms for DNA quantification. *Anal Bioanal Chem*, 408, 107–121.
- Perkel J, 2015: Guiding our PCR experiments. *BioTechniques*, 58 (5), 217.
- Pierce KE, Wangh LJ, 2007: Linear-after-the-exponential polymerase chain reaction and allied technologies. Real-time detection strategies for rapid, reliable diagnosis from single cells. *Methods Mol Med*, 132, 65–85.
- Price CW, Leslie DC, Landers JP, 2009: Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. *Lab Chip*, 9, 2484-2494.
- Porta AR, Enners E, 2012: Determining annealing temperatures for polymerase chain reaction. *Am Biol Teach*, 74 (4), 256–260.
- Phung TTB, Chu SV, Vu ST, Pham HT, Nguyen HM, Nguyen HD, Le NT, Nguyen DV, Truong PT, Vu VTT, Nguyen ATV, 2020: COLD-PCR method for early detection of antiviral drug-resistance mutations in treatment-naive children with chronic Hepatitis B. *Diagnostics*, 10 (7), 491.
- Ryazantsev DY, Voronina DV, Zavriev SK, 2016: Immuno-PCR: achievements and perspectives. *Biochem (Mosc)*, 81 (13), 1754-1770.
- Sanger F, Nicklen S, ve Coulson AR, 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74 (12), 5463–5467. Sanchez JA, Pierce KE, Rice JE, Wangh LJ, 2004: Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR: An advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. *Proc Natl Acad Sci*, 101 (7), 1933-1938.
- Seker E, Kus FS, 2019: Prevalence, virulence factors and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 on feces of adult ruminants slaughtered in three provinces of Turkey. *Vet Arhiv*, 89 (1), 107-121.
- Seker E, Ozenc E, Turedi OK, Yilmaz M, 2022: Prevalence of *mecA* and *pvl* genes in coagulase negative staphylococci isolated from bovine mastitis in smallholder dairy farms in Turkey. *Anim Biotechnol*, DOI: 10.1080/10495398.2022.2094802
- Seok Y, Byun JY, Mun H, Kim MG, 2014: Colorimetric detection of PCR products of DNA from pathogenic bacterial targets based on a simultaneously amplified DNAzyme. *Microchim Acta*, 181, 1965-1971.
- Sevindik E, 2013: Nested PCR and applications area. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6 (2), 22-26.
- Simsek M, Demir C, Seker E, 2021: Investigation of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (*bla<sub>NDM-1</sub>*) gene in carbapenem-resistant *Enterobacteriales* strains isolated from a university hospital in Turkey. *Med Sci*, 10 (2), 571-576.
- Şeker E, Özenç E, Baki Acar D, Yilmaz M, 2019: Prevalence of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin genes in *Staphylococci* isolated from Pirlak Sheep with subclinical mastitis in Turkey. *Kocatepe Vet J*, 12 (4), 424-429.
- Tekin K, Aygar İS, Hoşbul T, 2020: Basic Principles of Polymerase Chain Reaction Technology. *J Mol Virol Immunol*, 1 (1): 57-66.
- Ugozzoli L, Wallace RB, 1991: Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods*, 2 (1), 42-48.
- Wang X, Lim HJ, Son A, 2014: Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization. *J Toxicol Environ*, 29 (1), e2014007.
- Wang Y, Zhao Y, Bolla A, Wang Y, Au KF, 2021: Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol*, 39 (11), 1348-1365.
- Watson JD, Crick FH, 1953: Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171 (4356), 737-738.
- Witter CD, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP, 1997: Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, 22, 130-138.
- Zheng Z, Liebers M, Zhelyazkova B, Cao Y, Panditi D, Lynch KD, Chen J, Robinson HE, Shim HS, Chmielecki J, Pao W, Engelman JA, lafrate AJ, Leet LP, 2014: Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nat Med*, 20, 1479-1484.
- Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P, 2020: PCR past, present and future. *BioTechniques*, 69 (4), 317-325.



## Kedi ve Köpeklerde Prepubertal Gonadektomi

İlknur PİR YAĞCI<sup>1,a,\*</sup>

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-4470-8639

**Geliş Tarihi:** 07.06.2023

**Kabul Tarihi:** 21.06.2023

**Bu makale Nasıl kaynak gösterilir:** PİR YAĞCI İ. (2023). Kedi ve Köpeklerde Prepubertal Gonadektomi. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1): 126-133, DOI:10.31196/huvfd.1311324.

**\*Yazışma adresi:** İlknur PİR YAĞCI

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye.

e-mail: [ilknurpiryagci@gmail.com](mailto:ilknurpiryagci@gmail.com)

Online erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>

**Özet:** Kedi ve köpeklerde cerrahi kısırlaştırmalar tüm dünyada veteriner hekimlik uygulamaları arasında en yaygın olarak uygulanan cerrahi işlemlerdir. Coğrafi ve ekonomik farklılıklar operasyon oranlarını etkiliyor olsa da hayvan türleri baz alınarak incelendiğinde bu operasyonların ülkemizde de kedi ve köpeklerde en çok yapılan cerrahi işlem olduğu yadsınamaz bir gerçektir. Her ne kadar kullanılan cerrahi teknikler yetişkinlerle aynı olsa da pediatrik ve prepubertal hastaların fizyolojik özellikleri göz önüne alındığında operasyon öncesi, sırası ve sonrasında dikkat edilmesi gereken çok önemli farklılıklar ve noktalar bulunmaktadır. Sunulan derlemede prepubertal dönemdeki kedi ve köpeklerde uygulanan gonadektomilerde dikkat edilmesi gereken bu farklılıklara yer verilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Gonadektomi, Kedi, Köpek, Prepubertal.

### Prepubertal Gonadectomy in Cats and Dogs

**Abstract:** Surgical sterilization of cats and dogs is the most common surgical procedure among veterinary practices worldwide. Although geographical and economic differences affect the operation rates, it is undeniable that these operations are the most frequently performed surgical procedures in cats and dogs in Türkiye, based on animal species. Although the surgical techniques used are the same as in adults, some important differences and points should be considered before, during, and after the operation, considering the physiological characteristics of pediatric and prepubertal patients. In the present review, these differences are included, which should be regarded as the gonadectomies performed in cats and dogs in the prepubertal period.

**Keywords:** Cat, Dog, Gonadectomy, Prepubertal.

## Giriş

Kedi ve köpeklerde cerrahi sterilizasyon işlemi en yaygın olarak uygulanan cerrahi prosedür olarak kabul edilmektedir (Howe, 2015; Kustritz, 2007). Ülkemizde 16 farklı veteriner fakültesi Doğum ve Jinekoloji kliniklerine getirilen hastaların genel analizleri incelendiğinde yapılan ovaryohistektomi/ovarektomi operasyonlarının oranı en düşük %11,88 ile Atatürk Üniversitesi'nde (Çolak ve ark., 2018) ve en yüksek %62,90 ile Ankara Üniversitesi'nde (Baştan ve ark., 2018) bulunmuştur.

Kedi ve köpeklerde cerrahi sterilizasyon, dişilerde ovaryohistektomi, erkeklerde ise orşidektomi operasyonları ile yapılmaktadır. Aynı amaçla uygulanabilecek diğer cerrahi prosedürler histerektomi, vazektomi ve ovarektomidir (AVMA, 2020). Dişi kedi ve köpeklerde bilateral ovarektomi (OV; ooferektomi veya her iki ovaryumun uzaklaştırılması) ve ovaryohistektomi (OHE; ooforohistektomi veya ovaryumların ve uterusun uzaklaştırılması) reproduksiyonun kontrolü için uygulanan cerrahi prosedürler olarak bilinmektedir (Johnston ve ark., 2001). Bilateral OV son yıllarda özellikle laparoskopik uygulamaların veteriner sahada da kullanımının artmasıyla daha da tercih edilen bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (DeTora ve McCarthy, 2011; Tez ve Kanca, 2018). Erkek kedi ve köpeklerde ise orşidektomi (orşidektomi ya da kastrasyon) açık ya da kapalı teknikle bir ya da her iki testisin uzaklaştırılması işlemidir ve en çok uygulanan cerrahi sterilizasyon işlemidir. Vazektomi ise sadece ductus deferensin bir kısmının uzaklaştırılması ile spermatozoaların taşınmasının engellenmesi ve sekonder testiküler atrofi oluşturulması işlemidir. Ancak bu sırada steroidogenezis sağlanmadığı için androjen bağımlı hastalıklar ve istenmeyen erkek seksüel davranışlar hala meydana gelebilmektedir (AVMA, 2020; Johnston ve ark. 2001).

Kedi ve köpeklerde opsiyonel gonadektomi daha çok dişilerde ovaryohistektomi erkeklerde ise kastrasyon şeklinde yapılmaktadır. "Bu opsiyonel cerrahi işlemler gerçekleştirilmeli mi?" ve "Bu işlemlerin yapılacağı optimal yaş nedir?" soruları hasta sahipleri ve veteriner hekimlerin en sık sorduğu sorulardır (Bushby, 2020; Kustritz, 2007).

Kedi ve köpeklerde gonadektomi uygulamalarının birincil nedeni artan popülasyonunun kontrolüdür (Howe, 2015; Johnston ve ark., 2001; Kustritz, 2007). Bunun dışında dişi kedi ve köpeklerde piyometra gibi reproduktif sistem hastalıkları ve meme tümörü, erkeklerde ise benign prostat hiperplazisi ve testis neoplazilerini engellemek amacıyla yapılmaktadır (Howe, 2015). Ayrıca dişi hayvanlarda östrus siklusunda görülen istenmeyen davranışsal ve fizyolojik değişikliklerin ve erkek hayvanlarda diğer erkeklerle agresyon ve işaretleme gibi erkek davranışlarının önlenmesini de sağlamaktadır (Johnston ve ark., 2001). Gonadektomi operasyonu yaşam süresini erkek köpeklerde %13,8, dişilerde ise %26,3 oranında uzatmaktadır (Hoffman ve ark., 2013).

Tüm bu nedenler kedi ve köpeklerde gonadektomi için optimal yaşın ne zaman olduğu sorusunu akıllara getirmektedir (Bushby, 2020). Şu anda Amerika Birleşik Devletleri'ndeki birçok veteriner hekim gonadektomi

operasyonunun kedi ve köpeklerde 6 ile 9 ay arasında gerçekleştirmekle beraber bu yaş aralığının optimal yaş olduğunu bildiren herhangi bir bilimsel çalışma da bulunmamaktadır (Kustritz, 2007). Sunulan derlemenin amacı prepubertal yaşta yapılan gonadektomilerde dikkat edilmesi gereken noktalara ve bu yöntemin yararları ile risklerini veteriner hekimlere aktarmak ve bu konuda bir farkındalık oluşturmaktır.

### 1. Kedi ve Köpeklerde Pediatrik Fizyoloji

Köpek ve kedi yavruları doğumdan sonraki 4 ila 5. haftaya kadar yenidoğan, bu dönemden 12. haftaya kadar ise pediatrik olarak sınıflandırılır. Yenidoğanlarda anestezi ancak konjenital anomalilerin acil olarak düzeltilmesi veya zorunlu (isteğe bağlı değil) teşhis için gerekebilir. Pediatrik hastaların anestezisi ise elektif erken ovaryohistektomi veya kastrasyon ve acil prosedürler için yapılabilmektedir (Lukasik, 2006).

Yenidoğanların ve pediatrik hastaların fizyolojisi yetişkin köpeklere ve kedilere göre farklılık göstermektedir. Bu farklılıkların dengeli ve uygun doz içeren optimal anestezi planlarını formüle etmek için anlaşılması gerekir. Elektif prosedürler ile ameliyat sonrası ve acil durumlar için ameliyat öncesi analjezi anestezi deneyiminin çok önemli bir parçasıdır. Çünkü yenidoğan ve pediatrik hastalarda ağrı, eğer uygun şekilde tedavi edilmezse, yaşam boyu aşırı duyarlılık (allodini) gelişebilmektedir (Lukasik, 2006; Mathews, 2005).

Yenidoğan ve pediatrik hastalarının çoğunun anestezi rezerv kapasitesi sınırlıdır. Daha az fonksiyonel kontraktıl dokuya, sınırlı kardiyak rezerve ve düşük ventriküler kompliyansa sahiptirler ve bu nedenle atım hacmini (stroke volüm) artırma kabiliyetleri azalmıştır. Sempatik sinir sistemleri az geliştiği için bu hastaların vazomotor kontrolleri zayıf ve baroreseptör refleksleri azalmış olabilir. Bu nedenle kan kaybını daha az tolere ederler ve kan basıncını koruyamayabilirler. Her ne kadar sıvı yüklemesine hızla tepki vermeleri muhtemel olsa da pediatrik kedi ve köpekler, yetişkinlere nazaran aşırı sıvı yüklemesine daha az toleranslıdır (Farry ve Goodwin, 2017).

Ayrıca pediatrik hastalarda akciğer rezervi de sınırlıdır. Yetişkinlerle karşılaştırıldığında, dilin daha büyük olması ve hava yolundaki kıkırdakların daha yumuşak olması gibi anatomik farklılıklar pediatrik hastaları üst hava yolu obstrüksiyonlarına yatkın hale getirebilir. Bunlara ilave olarak, göğüs kafesi daha esnek, interkostal kaslar daha zayıf, akciğerler daha az uyumludur ve tüm solunum işlevi yetişkinlerden daha kapsamlıdır, bu nedenle bu durum hava yolu kollapsını ve solunum yorgunluğunu kolaylaştırır. Fonksiyonel rezidüel kapasite azdır, solunum kemoreseptörleri olgunlaşmamıştır ve oksijen ihtiyaçları azalmıştır. Tüm bunlar nedeniyle genç hayvanlar perianestetik dönem süresince hızlı desaturasyon ve hipoksemi riski altındadırlar. Köpek ve kedi yavruları hipoksemi ve solunum yorgunluğuna duyarlı oldukları için anestezi periyodu boyunca oksijen takviyesi yapılmalı ve gerektiğinde intermittent pozitif basınçlı ventilasyonun hızlı

bir şekilde başlayabilmesi için solunum sistemi dikkatli bir biçimde izlenmelidir (Farry ve Goodwin, 2017).

Çok genç hastalarda böbrek ve karaciğer sistemleri olgunlaşmamıştır. Sedasyon ve anestezi için en önemli hususlar, metabolizma hızı, biyotransformasyon ve ilaçların vücuttan atılımıdır. Anestezi sırasında aşırı bir etki veya etki süresinde uzama gözlemlenebilir. Pediatrik hastalar hipoglisemiye eğilimlidir çünkü glikojen depoları minimaldir ve glukoneogenezis yetenekleri zayıftır. Bu nedenle anestezi süresince kan şekerinin takibi ve glikoz içeren sıvıların uygulanması faydalı olmaktadır. Böbrek fonksiyonları da yetişkin köpek ve kedilere kıyasla düşüktür, bu da onların aşırı sıvı yüklenmesine ve hipotansiyona karşı toleranslarının daha düşük olmasıyla sonuçlanmaktadır (Farry ve Goodwin 2017).

Pediatrik hastalarda termoregülasyon azalmıştır ve vücut yüzey alanları vücut ağırlıklarına ve asgari yağ rezervlerine göre daha geniş olduğu için, hipotermiye karşı son derece savunmasız olmaktadır (Farry ve Goodwin, 2017; Lukasik, 2006). Ek olarak, çoğu anestezi ajanının termoregülatör merkezi etkilediği ve hipotermi oluşturduğu da bilinmektedir. Bu durum, azalan metabolizma hızı, enfeksiyonlara karşı artan duyarlılık, miyokardiyal depresyon, respiratorik depresyon ve ilaç metabolizmasında gecikmeler gibi birçok zararlı etki doğurabilir (Farry ve Goodwin, 2017).

Deri yüzey sıcaklığı ortam sıcaklığına bağlı olarak artmakta ve düşmektedir. Merkezi vücut sıcaklığı hipotalamus tarafından yakından düzenlenir; ancak bu düzenleme pediatrik hastalarda olgunlaşmamıştır ve yetersizdir. Vücudu izole etmek ve ısı kaybını önlemek için tasarlanmış üç doku katmanı vardır ancak genel olarak, pediatrik hastaların çoğunda üç tabakanın da kalınlıkları yetersizdir. Tüm pediatrik hastalar ameliyat öncesi, anestezi süresince ve ameliyat sonrasında normotermik tutulmalıdır (Lukasik, 2006).

## 2. Prepubertal Gonadektomi

### 2.1. Operasyon Hazırlığı

Diğer operasyonlarda olduğu gibi prepubertal gonadektomiler öncesinde hastanın kapsamlı değerlendirilmesi son derece önemlidir. Hasta sahibinden alınacak anamnez bilgileri, diyet ve barınma koşullarını (iç mekana karşı dış mekan), koruyucu sağlık durumunu (örn. son aşı tarihi ve dışkı muayenesi, kedilerde önceki FeLV (kedi lösemi virüsü) testi vb.) ve önceki anestezi epizotlarını içerebilir. Obezite, diyabet, hipertiroidizm, renal yetmezlik, hepatik lipidoz, hipertrofik kardiyomiyopati (HCM) ve astım gibi tüm anormallikler ayrıca klinik olarak araştırılmalıdır (Reuss-Lamky, 2020).

Pediatrik hastaların karaciğerlerinde minimum sayıda glikojen depoları bulunduğundan operasyon öncesi açlık süresi minimum tutulmalıdır. Midenin boşalması için yaklaşık iki ila dört saatlik bir açlık süresi yeterlidir. Premedikasyon verildiğinde suyu da önünden kaldırılmalıdır. Genç ve sağlıklı hastalar için laboratuvar testleri; hematokrit seviyesi (sıkıştırılmış eritrosit hacmi, packed cell volüme, PCV), toplam plazma solitleri (TPS), kan üre azotu (BUN) ve kan şekerini içermelidir. Dengeli bir ilaç kombinasyonu ile premedikasyon en çok arzu edilenidir. Farklı sınıflardan

ilaçların birleştirilmesi, tek tek ilaç dozlarının azaltılmasını sağlayacak ve istenmeyen yan etkilerini sınırlarken aynı zamanda optimal stresin azalmasını ve preemptif analjeziyi sağlayacaktır (Lukasik, 2006).

Premedikasyondan sonra hastalar sessiz bir ortama yerleştirilmeli ve maksimum ilaç etkisi oluşuncaya kadar rahatsız edilmemelidir. Ameliyat öncesi bekletme alanındaki ortam sıcaklığı nispeten sıcak olmalı veya sedasyondan sonra hipotermi yaygın olduğu için harici bir ısı kaynağı sağlanmalıdır. Şekillenebilecek istenmeyen ürinyasyon veya defekasyon gibi durumlar sonrasında idrar veya dışkının emilmesi için hasta havlu veya kıyılmış kağıt üzerine yerleştirilmelidir (Lukasik, 2006).

Gerekli tüm ilaç ve ekipmanların önceden hazır bulundurulması önemlidir. Buna uygun solunum devresi, doğru boyutta endotrakeal tüp ve rezervuar torbası, gerekirse CO<sub>2</sub> (karbondiyoksit) emicisinin değiştirilmesi, anestezi makinesinin sızıntı kontrolü ve yeterli oksijen ve sıvı anestezi kaynağı sağlanması dahildir. İlaç uygulanmadan önce herhangi bir komplikasyona hazırlıklı olmak başarılı bir anestezinin anahtarıdır (Lukasik, 2006; Reuss-Lamky, 2020).

### 2.2. Genel Anestezi

Genel anestezi, hareketsizliği, kas gevşemesini, bilinç kaybını ve ağrıdan kurtulmayı sağlayan geri dönüşümlü bir süreçtir. Pediatrik hastalarda genel anestezinin indüksiyonu yüz maskesi ile inhalasyon anestezi uygulaması yerine enjekte edilebilir ilaçlar kullanılarak da en iyi şekilde yapılabilir. Genel olarak, enjekte edilebilir indüksiyonlar tercih edilir çünkü daha hızlı bir bilinç kaybına izin verir, hasta daha az mücadele eder, hava yolunun daha erken kontrolünü sağlar ve hasta ve personel için daha az fiziksel yaralanma tehlikesi oluşturur. İntravenöz (IV) anestezi indüksiyonu için birçok ilaç mevcuttur. IV indüksiyonu için popüler ilaçlar arasında propofol, alfaksalon, etomidat ve midazolam ile ketamin kombinasyonu bulunur (Lukasik, 2006).

Anestezi indüksiyonunu takiben hemen endotrakeal tüp yerleştirilmelidir. Hastanın solunum hızı, kalp hızı ve ritmi, mukozal membranlarının rengi, kapillar dolgunluk zamanı (Capillary Refill Time; CRT), arteriyel kan basıncı, Elektrokardiyogramı (EKG), ETCO<sub>2</sub> (endtidal karbondiyoksit) ve sıcaklığı anestezi indüksiyonundan hemen sonra takip edilmeye başlanmalı ve anestezi süresince beş dakika aralıkla kontrol edilmelidir (Borstad, 2015; Lukasik, 2006; Reuss-Lamky, 2020). Tablo 1-4'de kedi ve köpeklerde operasyonda tercih edilebilecek anestezi protokolleri belirtilmiştir.

### 2.3. Operasyon Tekniği

Ovarektomi ya da ovaryohistektomi operasyonu hem klasik hem de laporoskopik yöntemle köpeklerde sağ veya sol açıklık çukurluğundan ve tercihen median hattan, kedilerde ise genellikle sağ veya sol açıklık çukurluğundan yapılmakla beraber median hattan da yapılabilir (Erdem, 2022). Pediatrik ovarektomi ve ovaryohistektomide kullanılan cerrahi teknikler yetişkin hayvanlarla genel olarak aynıdır (Ehrhardt, 2012; Kustritz, 2014; Lukasik, 2006). Ovarektomi operasyonunda teknik ovaryohistektomi ile benzerdir. Bununla birlikte ovarektominin deri ensizyonu daha küçüktür ve daha kranialden yapılmaktadır (Erdem, 2022). Genel olarak ovarektomi operasyonlarında operasyon ve anestezi sürelerinin daha kısa, ensizyon hattının daha küçük ve

**Tablo 1.** Erkek köpek yavrularının kastrasyon operasyonlarında kullanılan anestezi protokolleri (Borstad, 2015).

Yaş (hafta)	Premedikasyon (mg/kg)	İndüksiyon (mg/kg)	Devamlılık
6-14	Atropin (0.04) IM Oxymorphone (0.22) IM	Propofol (6.5) IM, premedikasyondan 15 dakika sonra yavaşça	Isoflurane (eğer gerekirse)
6-14	Midazolam (0.22) IM Butorphanol (0.44) IM	Propofol (6.5) IM, premedikasyondan 15 dakika sonra yavaşça	Isoflurane (eğer gerekirse)
<20	Glycopyrrolate (0.011) IM Butorphanol (0.22) IM	Pentothal (22) IV, etkisine göre doze edilmiş	Isoflurane veya Halothane
20-24	Glycopyrrolate (0.011) IM Butorphanol (0.22) IM Acepromazine (0.026) IM	Pentothal (22) IV, etkisine göre doze edilmiş	Isoflurane veya Halothane

**Tablo 2.** Dişi köpek yavrularının ovaryohistektomi operasyonlarında kullanılan anestezi protokolleri (Borstad, 2015).

Yaş (hafta)	Premedikasyon (mg/kg)	İndüksiyon (mg/kg)	Devamlılık
6-14	Atropin (0.04) IM Oxymorphone (0.11) IM	Propofol (3.4) IM, premedikasyondan 15 dakika sonra yavaşça	Isoflurane
6-14	Atropin (0.04) IM Oxymorphone (0.11) IM Tiletamine-Zolazepam (13.2) IM	Isoflurane (maske ile)	Isoflurane
6-14	Midazolam (0.22) IM Butorphanol (0.44) IM	Isoflurane	Isoflurane
6-14	Tiletamine-Zolazepam (13.2) IM	Isoflurane	Isoflurane
<20	Glycopyrrolate (0.011) IM Butorphanol (0.22) IM	Pentothal (22) IV, etkisine göre doze edilmiş	Isoflurane veya Halothane
20-24	Glycopyrrolate (0.011) IM Butorphanol (0.22) IM Acepromazine (0.026) IM	Pentothal (22) IV, etkisine göre doze edilmiş	Isoflurane veya Halothane

**Tablo 3.** Kedi yavrularında ovaryohistektomi ve kastrasyon için anestezi protokolleri (Borstad, 2015).

Yaş (hafta)	Premedikasyon/İndüksiyon (mg/kg)	Devamlılık	Prosedür
6-14	Tiletamine-Zolazepam (11) IM	Isoflurane	OHE-Kastrasyon
6-14	Atropin (0.04) IM Midazolam (0.11) IM Ketamine (11) IM Oxymorphone (0.07) IM	Isoflurane	OHE-Kastrasyon
6-14	Midazolam (0.22) IM Ketamine (22) IM	Isoflurane	OHE-Kastrasyon
6-14	Atropin (0.04) IM Midazolam (0.22) IM Ketamine (11) IM Butorphanol (0.44) IM	Isoflurane	OHE-Kastrasyon
<24	Glycopyrrolate (0.011) IM Butorphanol (0.44) IM Acepromazine (0.055) IM Ketamine (11) IM	Isoflurane	OHE-Kastrasyon

**Tablo 4.** Kedi ve köpek yavrularının gonadektomi operasyonları için optimal anestezi protokolleri (Faggella ve Aronsohn 1994).

Tür/Cinsiyet	Optimal Anestezi Protokolü
Köpek, erkek	Atropinden (0.04 mg/kg IM) 15 dakika sonra Propofol (6.5 mg/kg IV) ve oksimorfon (0.22 mg/kg IM). Oksimorfon yerine Midazolam (0.22 mg/kg IM) ve butorfanol (0.44 mg/kg IM) kullanımı daha az sedasyon ama daha iyi analjezi sağlar.
Köpek, dişi	Atropinden (0.04 mg/kg IM) 15 dakika sonra Propofol (3.4 mg/kg IV) ve oksimorfon (0.11 mg/kg IM). Anestezinin devamı için entübasyon-inhalasyon.
Kedi, erkek	Tiletamine-zolazepam (11 mg/kg IM)
Kedi, dişi	Midazolam (0.22 mg/kg IM) ve ketamin (11 mg/kg IM). Anestezinin devamı için entübasyon-inhalasyon.

abdominal travma derecesinin ovaryohistektomi uygulanan hayvanlara göre daha düşük olarak bulunduğu bildirilmektedir (Johnston ve ark., 2001). Ovaryektomi ile ovaryohistektomi operasyonlarının özellikle uzun dönem kedi ve köpek sağlığına olan etkileri karşılaştırıldığında, ovarektomi operasyonunun olumsuz bir etkisi olduğuna dair bir veri bulunmamaktadır (Howe, 1997; Howe, 2006; Erdem, 2022).

Erkek hayvanlarda genellikle iki testis de köpeklerde 12-14. haftaya kadar ve kedilerde ise doğumda skrotuma iner. Ancak kriptorşidi vakalarında anestezi ve operasyon riskleri daha fazla olduğu için gecikmenin olduğu hastalarda veteriner hekimler operasyonu erteleyebilmektedirler (Kustritz 2014). Kedilerde kastrasyon (orşidektomi), yetişkin hayvanlarda olduğu gibi gerçekleştirilmektedir. Ancak pediatrik hastalarda spermatik kordun kendi üzerine bağlanması önerilmemektedir, çünkü spermatik kord kısa ve dokular gevrek olabilir. Çok genç köpek yavrularında ise kastrasyon, kedilerde olduğu gibi, bilateral skrotal insizyon ve bu insizyonların dikiş uygulaması yapmaksızın kendiliğinden iyileşmesi ile yapılabilir veya yetişkin köpeklerde olduğu gibi bu insizyonlar dikiş uygulaması ile kapatılabilir (Ehrhardt, 2012; Kustritz, 2014).

Pediatrik hayvanlarda hematopoez, iki ila üç aylık olana kadar etkili bir şekilde başlamamakta, bu da pediatrik hastanın hemorajiye dayanma kabiliyetini daha da sınırlamaktadır. Kan kaybı, yeterli cerrahi hemostaz ile önlenmeli veya doku hipoksisine bağlı ciddi fizyolojik sonuçlar oluşmadan agresif bir şekilde tedavi edilmelidir (Lukasik, 2006).

Hipotermi sonrasında vücut yüzey alanının en az %60'ı harici bir ısı kaynağıyla temas etmedikçe etkili bir yeniden ısınma gerçekleşemez. Hipotermiyi önlemek için tercih edilen yöntemler arasında ortam sıcaklığının kontrol edilmesi bulunur: oda sıcaklığı en az 23-24°C olmalıdır. Ayrıca hastaların kabarcıklı sargılarla, plastik sargılarla ya da ısıtılmış battaniyelerle sarılması, kullanılan tüm solüsyonların ısıtılması, uygulanan tüm intravenöz sıvıların ısıtılması, inspire edilen tüm gazların yapay burun (HumidVent®, Gibeck) kullanılarak ısıtılması ve nemlendirilmesi, ısıtmalı bir solunum devresi (Darvall Isıtmalı Solunum Sistemi) kullanılması, 40 ila 42 °C arasında sıcaklığa sahip sıcak su battaniyelerinin kullanılması, basınçlı sıcak hava değişim battaniyesinin (Bair Hugger®) kullanılması, ameliyat sonrası hastaları kuru tutmak veya ıslaksa aktif olarak kurutmak (el tipi fön makinesi) ya da sıcak su şişeleri (en fazla 42 °C) hipotermi engellenmesi için yapılabilecek diğer girişimlerdir. Hipotermi gibi hipertermi olasılığı nedeniyle de bir hastanın sıcaklığının yakından izlenmesi önemlidir (Lukasik, 2006; Reuss-Lamky, 2010).

#### 2.4. Postoperatif Bakım

Operasyonlar tercihen gaz anestezi ile yapılır ve bu yöntem pediatrik köpek ve kedilerde enjekte edilebilir ilaçlara tercih edilmektedir. En sık kullanılan gaz anestezi izofluran ve sevoflurandır. Tüm inhalasyon anestezi bir dereceye kadar vazodilatasyon, hipotansiyon, miyokardiyal depresyon ve solunum depresyonuna neden olmaktadır. Diğer istenmeyen yan etkileri ise bulantı, kusma, ileus ve kardiyak aritmilerdir. Gaz anestezi hepatik

metabolizmaya çok az uğrarlar ve eliminasyonları akciğer yoluyla yapılmaktadır ve bu nedenle anestezi sonrası çıkış genellikle inhalan uygulamasının kesilmesinden sonra oldukça hızlıdır. Sevofluran ile tedavi edilen hastalar spontan solunum sırasında izofluran uygulanan hastalara kıyasla daha az solunum depresyonu yaşarlar (Lukasik, 2006).

Ameliyat sonrası dönemde hastaların desteklenmesi ve izlenmesi gerekir. Bu dönemde gerekli analjezi sağlamak da hayati önem taşımaktadır. Pediatrik hastalara analjeziklerin uygulanması sıklıkla göz ardı edilmektedir veya uygun dozlarda verilmemektedir. Analjezik protokoller, cerrahi prosedürün invazivliğine ve ameliyat sonrası beklenen ağrı derecesine göre tasarlanmalıdır. Analjezikler en az 48 ila 72 saat süreyle uygulanmalıdır (Lukasik, 2006). Pediatrik terimi genellikle yaşamın ilk 6 ayını ifade etmektedir. Bu zaman çerçevesinde meydana gelen önemli fizyolojik değişiklikler nedeniyle, bu inceleme için başka bir sınır tanımlanmaktadır: neonatal (0-2 hafta), infant süttten kesim (6-12 hafta) ve juvenil (3-6 ay). Bu ayırım, genel olarak bu olgunlaşma dönemleri sırasında meydana gelen metabolik değişikliklerden haberdar olunmasını sağlamak için yapılmıştır. Üç-6 aylık dönem arasındaki hayvanlarda, analjeziyi sağlamak için yetişkin doz rejimlerine ihtiyaç duyuluyor gibi görünmektedir (Mathews, 2005).

#### 3. Prepubertal Gonadektominin Yararları

Gonadektomilerin birincil toplumsal yararı özellikle sahipsiz hayvanların nüfus kontrolüdür. Pediatrik gonadektomi, büyük ölçüde nüfus kontrolü nedenleriyle veteriner uygulamalarından daha yaygın olarak insancıl kuruluşlar aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Sahiplendirilmeden önce yapılan gonadektomi, sahiplendirilen hayvanların istenmeyen yavrularının hayvan barınakları doldurmasını azaltmakta ve bu hayvanların sahiplendirilme olasılıklarının artmasını sağlamaktadır (Kustritz, 2014). Ayrıca erken yaşta gonadektomi için geçerli olan birçok medikal ve davranışsal fayda bulunmaktadır. Bunlar Tablo 5'te kısaca özetlenmektedir (RSPCA, 2010). Genç hastalarda anatomik yapılar daha az geliştiği için operasyon daha hızlı ve kolaydır. Enjekte edilen daha az yağ ve diğer dokular olduğu için yaratılan doku travması da küçüktür. Genellikle cerrahi ensizyon bölgesi daha küçüktür ve kanama ya yoktur ya da minimaldir. Hayvanların ameliyat için hazırlanması daha az zaman alır, bu da genel anestezi altında daha az zaman anlamına gelir. Anestezi sonrası uyanma ve yara iyileşme süresi önemli ölçüde kısadır. Hem operasyon ve hem de anestezi sürelerinin anlamlı derecede kısa olması nedeniyle ameliyat sırasında komplikasyon insidansı de düşüktür. Ayrıca genç hastalarda nispeten çok daha düşük dozdaki anestezi ajanlarla istenen anestezi sağlanabildiği için anestezi maliyeti de daha az olmaktadır (RSPCA, 2010). Ayrıca pubertas öncesinde yapılan gonadektomilerin genel olarak kabul edilen yukarıda saydıklarımıza ek bazı avantajları da bulunmaktadır. Pubertasa ulaşmamış hayvanlara uygulanan gonadektomi, ilk östrus siklusunda daha çok dişi kedilerde gebelik ile ilgili tüm riskleri tamamen ortadan kaldırır. Dişi hastalar gonadektomi sırasında kesin olarak gebe ya da östrusta olamayacağından yapılan operasyon çok daha basit bir işlem haline gelir. Pubertas öncesi yapılan gonadektomi, dişi kedi ve köpeklerde malign



**Tablo 5.** Genel olarak gonadektominin medikal ve davranışsal faydaları (RSPCA, 2010).

Tür	Fayda
<b>Erkek Köpek</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prostatit'in önlenmesi</li> <li>• Bening prostat hiperplazisinin önlenmesi</li> <li>• Dişi köpekleri bulmak için dolaşmanın/dolaşmaya ilginin azalması</li> <li>• Testisler ve anüste görülen belirli hernia ve tümör türlerinin önlenmesi</li> <li>• İstenmeyen tırmanma hareketinin azaltılması</li> <li>• Diğer erkek köpeklere yönelik saldırgan davranışların azaltılması</li> <li>• İdrarla işaretlemenin azaltılması</li> </ul>
<b>Dişi Köpek</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meme tümörünün önlenmesi (özellikle ilk östrüstan önce yapıldığında)</li> <li>• Piyometra ve ovaryum tümörü gibi çeşitli genital sistem hastalıklarının önlenmesi</li> <li>• İstenmeyen gebeliklerin önlenmesi</li> <li>• Yalancı gebelik davranışlarının önlenmesi</li> </ul>
<b>Erkek Kedi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testis kanserinin önlenmesi</li> <li>• Dişi kedi bulmak için dolaşma/dolaşmaya olan ilginin azalması: bu esnasında oluşabilecek istenmeyen durumların önlenmesi</li> <li>• Diğer erkek kedilerle kavga azalması: kavga yaralanmaları ve Feline Immunodeficiency Virus (FIV) gibi kavga sırasında bulaşabilecek hastalık riskinin azalması</li> <li>• İdrarla işaretlemede (püskürtme) azalma</li> <li>• Saldırganlıkta azalma</li> <li>• İnsanlara karşı sevgi artışı</li> <li>• Türler arası saldırganlıkta azalma</li> </ul>
<b>Dişi Kedi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meme tümörünün önlenmesi</li> <li>• Ovaryum tümörü genital sistem hastalıklarının önlenmesi</li> <li>• İstenmeyen/plansız gebeliklerin önlenmesi</li> <li>• Huzursuzluk ve yüksek sesle uluma benzeri ses çıkartma gibi rahatsız edici "östrus" davranışlarının önlenmesi</li> <li>• İnsanlara karşı sevgi artışı</li> <li>• Türler arası saldırganlıkta azalma</li> </ul>

meme tümörü insidansını önemli ölçüde azaltır (RSPCA, 2010). Özellikle 5.5 aydan daha erken bir zamanda yapılan gonadektomilerin kedilerde saldırganlık, cinsel davranışlar, idrar püskürtme ve hiperaktivitede azalma (Spain ve ark., 2004a), köpeklerde ise ayrılık ankisiyitesi, kaçma davranışları, korku durumunda azalma (Spain ve ark., 2004b) gibi davranışsal faydaları olduğu da düşünülmektedir.

#### 4. Prepubertal Gonadektominin Olası Riskleri

Birçok araştırmacı, pediatrik kısırlaştırma ile ilgili endişelerini dile getirmişlerdir. Endişeler, potansiyel uzun vadeli fizyolojik etkilere veya anestezi riskine odaklanmıştır.

##### 4.1. Anestezi ve cerrahi

Güvenli erken dönem gonadektomi; pediatrik anestezi ve cerrahide uygun eğitim gerektirir ve kullanılan preoperatif, operatif ve postoperatif protokollerin sağlanabilmesi için uygun kaynaklara ve ekipmana erişime dayanır. Bu önlemlerin mevcut olması koşuluyla, erken dönem gonadektomilerde anestezi komplikasyonu insidansının geleneksel yaş gonadektominine benzer olduğunu görülmektedir (Bushby ve Griffin, 2011; Howe, 1997; Howe, 2006; Looney ve ark., 2008; RSPCA, 2010).

##### 4.2. Obezite

Obezite birçok faktörün etkilediği bir sorundur (Bushby ve Griffin, 2011). Diyet, egzersiz ve genetik gibi birçok durum obeziteye sebep olduğu için kısırlaştırmanın obezite üzerinde etkisini tam olarak kesinleştirmek mümkün değildir (Yates ve Leedham, 2019). Bu nedenle, bu noktada, veteriner hekimin uygun bir vücut kondisyonunun korunmasını sağlamak için uygun bir diyet ve yeterli egzersiz fırsatlarını sağlamanın

önemini hasta sahiplerine iyi anlatması gerekmektedir (Rowe ve ark., 2017).

#### 4.3. Yetersiz Gelişim (Büyüme)

İlk olarak akla gelen yetersiz gelişim endişesinin yanlış olduğu kanıtlanmıştır (Bushby ve Griffin, 2011). Hormonal etkinin ortadan kalkması aslında büyüme plaklarının geç kapanmasına neden olmaktadır. Bu nedenle pediatrik kısırlaştırma uygulanan köpeklerin uzun kemikleri, 6 aylıktan sonra kısırlaştırılan hayvanlara göre biraz daha uzundur; büyüme orantısız değildir ve büyüme eğrisi aynıdır (Salmeri ve ark., 1991). Ancak yapılan bazı retrospektif çalışmalar bazı köpek ırklarında (Golden Retrievers, Labrador vs) pubertas öncesi yapılan gonadektomilerin her ikisi de ağırlıklı olarak büyük cins köpeklerde görülen kalça displazisi ve kranial çapraz bağ hastalıklarının (yırtilma ve yaralanma) gelişimi için mevcut riskleri 1.5 ila 2 kat artıran bir faktör olabileceğini bildirmektedir. Bu nedenle özellikle bu tür hastalıklara yatkınlıkları olduğu bilinen büyük ve dev ırk köpeklerde gonadektomilerin büyüme plaklarının kapanmasını bekledikten sonra yapılmasının bu tür olası ortopedik riskleri en aza indirdiği belirtilmektedir (De La Riva ve ark., 2013; Van Hagen ve ark., 2005).

#### 4.4. Dişi Hayvanlarda Vaginitis ve Perivulvar Dermatitis

Prepubertal kedi ve köpeklerde vaginitis riski yetişkin hayvanlarla benzer bulunmuştur (Bushby ve Griffin, 2011). Özellikle dişi köpeklerde görülen perivulvar dermatitisin insidansının ise ovaryohistektomi ile ilişkisi olsa da kısırlaştırma yaşı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ancak özellikle obezitenin perivulvar dermatitisi daha da

kötüleştirdiği bilinen bir gerçektir (Salmeri ve ark., 1991; Spain ve ark., 2004a; Spain ve ark., 2004b).

#### 4.5. Kedilerde Üriner Tıkanıklıklar

Pediyatrik kastrasyonun erkek kedilerde penis üretrasının çapını azaltacağı ve dolayısıyla üriner obstrüksiyona yol açacağı düşünülmüştür. Ancak yapılan çalışmalar erkeklerde kısırlaştırma yaşının üretranın çapını etkilemediğini göstermektedir (Bushby ve Griffin, 2011; Root ve ark., 1996).

#### 4.6. Üriner İnkontinens

Küçük hayvan hekimliğinde yaygın olarak karşılaşılan bir problem olan üriner inkontinens, konjenital anatomik anormallikler, idrar retensiyonu ve taşma inkontinansı veya özellikle östrojen eksikliği ile şekillenebilen sfinkter yetersizliğinden kaynaklanabilir. Üriner inkontinensin ne zaman başladığı ve bir köpeğin mesanesini boşaltma yeteneği, altta yatan nedeni belirlemede önemlidir. Davranış değişiklikleri de idrar kaçırmada önemli faktörlerdir. Üriner sfinkter mekanizmasındaki yetersizliğe bağlı üriner inkontinens özellikle vücut ağırlığı 15 kg'ın üzerinde olan ırklarda (Old English Sheepdog, Doberman Pinscher, Boxer, German Shepherd ve Weimeraner) daha fazla görülmekte ve yapılan gonadektomiler de insidansı artırmaktadır (Howe, 2015; Byron, 2018).

#### 4.7. Neoplazik Hastalıklar

Yapılan retrospektif çalışmalarda kısırlaştırılan erkek ve dişi köpeklerde bazı neoplazi türlerinin (osteosarkoma, hemanjiosarkoma, lenfoma, transisyonel hücre karsinomu, prostatik tümörler ve mast hücre tümörleri) daha yaygın olduğu bildirilmektedir (Cooley ve ark., 2002; Cornell ve ark., 2000). Ancak yapılan gonadektomilerin neoplazi gelişme riski üzerindeki etkisi düşünüldüğünde dikkate alınması gereken çok sayıda faktör vardır. Belirli bir hastalığın morbidite ve mortalitesini ve bu hastalığın popülasyondaki prevalansını, hayvanın cinsiyeti, yaşı, cinsi ve çevresi ile bağlantılı olarak dikkatlice değerlendirmek önemlidir. Belirli neoplazi tiplerinin daha yüksek insidansının ise kısırlaştırılmış hayvanlarda kısmen daha uzun yaşam süresine atfedilebileceği de dikkate alınmalıdır (Yates ve Leedham, 2019).

### Sonuç

Genç hastalarda anestezi ve cerrahi işlemin süresinin daha az ve komplikasyon risklerinin de daha düşük olması ve özellikle istenmeyen gebelikler, meme tümörü, piyometra, benign prostat hipertrofisi gibi birçok reproduktif durumun engellenmesi ve tabii ki veteriner hekimler için tekniğin daha kolay ve işlemin maliyetinin daha düşük olması kedi ve köpeklerde daha erken yaşta gonadektomilerin uygulanmasını artırmıştır. Genel olarak, standart aşılamalardan iki ila üç hafta sonra, yavrular 4 veya 5 aylıkken yapılan girişimler, hayvanların pubertas öncesi kısırlaştırılmalarını sağlarken aşılama yoluyla bağışıklık geliştirmeleri için de zaman tanımaktadır. Özellikle de ülkemizde giderek artan ve toplumsal bir sorun haline gelen sokak hayvanı popülasyonunun gerçekten kontrol altına alınmasında pubertas öncesi yapılan gonadektomilerin çok büyük katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

### Çıkar çatışması

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

### Benzerlik Oranı

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

### Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: İPY

Tasarım: İPY

Denetleme/Danışmanlık: İPY

Veri Toplama ve/veya İşleme: İPY

Analiz ve/veya Yorum: İPY

Kaynak Taraması: İPY

Makalenin Yazımı: İPY

Eleştirel İnceleme: İPY

### Kaynaklar

- Amerika Veteriner Hekimler Birliği (American Veterinary Medical Association, AVMA), 2020: Spaying and neutering. Erişim adresi: <https://www.avma.org/resources/petowners/pet-care/spaying-and-neutering>. Erişim tarihi: 22.01.2020.
- Baştan A, Salar S, Kurt S, 2018: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Kliniğine 2011-2017 Yılları Arasında Getirilen Vakaların Analizi. In: Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Kliniklerine Getirilen Vakaların Analizi, Çetin H (Ed), 7-11, Ankara: Türkiye Klinikleri.
- Borstsad K, 2015: Prepubertal gonadectomy in dog and cat. <https://pdfs.semanticscholar.org/ab66/65a54a0b33908315aee4c57c1fb63e4c82da.pdf>, Erişim tarihi; 03.02.2020.
- Bushby PA, 2020: The Optimal Age for Spay/Neuter: A Critical Analysis of Spay Neuter Literature, [https://cdn.ymaws.com/www.pavma.org/resource/resmgr/docs/kvc/2018/bushby\\_p\\_hillip/1theoptimalageforspayneuter.pdf](https://cdn.ymaws.com/www.pavma.org/resource/resmgr/docs/kvc/2018/bushby_p_hillip/1theoptimalageforspayneuter.pdf), Erişim tarihi; 22.01.2020.
- Bushby PA, Griffin B, 2011: An overview of pediatric spay and neuter benefits and techniques. <https://www.dvm360.com/view/overview-pediatric-spay-and-neuter-benefits-and-techniques>, Erişim tarihi; 15.03.2023.
- Byron JK, 2018: Canine Urinary Incontinence. *Am Vet*, 3 (5), 17-20.
- Cooley DM, Beranek BC, Schlittler DL, Glickman NW, Glickman LT, Waters DJ, 2002: Endogenous gonadal hormone exposure and bone sarcoma risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 11, 1434-1440.
- Cornell KK, Bostwick DG, Cooley DM, Hall G, Harvey HJ, Hendrick MJ, Pauli BU, Render JA, Stoica G, Sweet DC, Waters DJ, 2000: Clinical and pathologic aspects of spontaneous canine prostate carcinoma: A retrospective analysis of 76 cases. *Prostate*, 45 (2), 173-183.
- Çolak A, Polat B, Cengiz M, Cannazik O., 2018: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Kliniğine 2007-2017 Yılları Arasında Getirilen Vakaların Analizi. In: Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Kliniklerine Getirilen Vakaların Analizi, Çetin H (Ed), 18-22, Ankara, Türkiye Klinikleri.
- De La Riva GT, Hart BL, Farver TB, Oberbauer AM, Messam L, Willits N, Hart LA, 2013: Neutering Dogs: Effects on Joint Disorders and Cancers in Golden Retrievers. *PLoS ONE*, 8:e55937.

- DeTora M, McCarthy RJ, 2011: Ovariohysterectomy versus ovariectomy for elective sterilization of female dogs and cats: is removal of the uterus necessary? *JAVMA*, 239 (11), 1409-1412.
- Ehrhardt EE, 2012: How to perform an ovariectomy. <https://www.dvm360.com/view/how-perform-ovariectomy>, Erişim tarihi, 04.02.2020.
- Erdem H, 2022: Kedi ve Köpeklerde Laparotomik Ovariectomi ve Ovaryohisterektomi. In: Kedi ve Köpeklerde Jinekolojik ve Obstetrik Operasyonlar, Tekeli T (Ed), 100-104, Ankara, Türkiye Klinikleri.
- Faggella AM, Aronsohn MG, 1994: Evaluation of anesthetic protocols for neutering 6- to 14-week-old pups. *J Am Vet Med Assoc*, 205 (2), 308-314.
- Farry T, Goodwin W, 2017: Anesthesia for Pediatric Patients. <https://todaysveterinarynurse.com/articles/anesthesia-for-pediatric-patients/>, Erişim tarihi, 23.01.2020.
- Hoffman JM, Creevy KE, Promislow DEL, 2013: Reproductive Capability is Associated with Lifespan and Cause of Death in Companion Dogs. *PLoS ONE*, 8 (4): e61082.
- Howe LM, 1997: Short-term results and complications of prepubertal gonadectomy in cats and dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 211 (1), 57-62.
- Howe LM, 2006: Surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66, 500-509.
- Howe LM, 2015: Current perspectives on the optimal age to spay/castrate dogs and cats. *Vet Med (Auckl)*, 6, 171-180.
- Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS, 2001: Canine and Feline Theriogenology. 1<sup>st</sup> ed., 168-542, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Kustritz MV, 2007: Determining the optimal age for gonadectomy of dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*, 231 (11), 1665-1675.
- Kustritz MV, 2012: Effects of surgical sterilization on canine and feline health and on society. *Reprod Domest Anim*, 47 (4), 214-222.
- Kustritz MV, 2014: Pros, Cons, and Techniques of Pediatric Neutering. *Vet Clin Small Anim*, 44, 221-233.
- Looney AL, Bohling MW, Bushby PA, 2008: The association of shelter veterinarians veterinary medical care guidelines for spay-neuter programs. *J Am Vet Med Assoc*, 233 (1), 74-86.
- Lukasik V, 2006: Anesthesia of the pediatric patient. *NAVTA Journal (Fall)*, 52-57.
- Mathews CA, 2005: Analgesia for the pregnant, lactating and neonatal to pediatric cat and dog. *JVECC*, 15 (4), 273-284.
- RSPCA, 2010: Early-age desexing of dogs and cats. <https://www.rspca.org.au/sites/default/files/website/Campaigns/responsiblepetownership/Early%20Age%20Desexig%20Research%20Report%202010.pdf>, Erişim tarihi: 15.02.2023.
- Reuss-Lamky H, 2020: Purr-Fect Feline Anesthesia. <https://www.isvma.org/wp-content/uploads/2020/10/PurrfectFelineAnesthesia.pdf>, Erişim tarihi: 18.04.2023.
- Root MV, Johnston SD, Johnston GR, Olson PN, 1996: The effect of prepuberal and postpuberal gonadectomy on penile extrusion and urethral diameter in the domestic cat. *Vet Radiol Ultrasound*, 37, 363-366.
- Rowe C, Browne WJ, Casey RA, Gruffydd-Jones TJ, Murray JK, 2017: Early-life risk factors identified for owner-reported feline overweight and obesity at around two years of age. *Prevent Vet Med*, 143, 39-48.
- Salmeri KR, Bloomberg MS, Scruggs SL, Shille V, 1991: Gonadectomy in immature dogs: effects on skeletal, physical, and behavioral development. *J Am Vet Med Assoc*, 198 (7), 1193-1203.
- Spain CV, Scarlett JM, Houpt KA, 2004a: Long-term risks and benefits of early-age gonadectomy in cats. *J Am Vet Med Assoc*, 224, 372-379.
- Spain CV, Scarlett JM, Houpt KA, 2004b: Long-term risks and benefits of early-age gonadectomy in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 224, 380-387.
- Tez G, Kanca H, 2018: Laparoskopinin Veteriner Jinekolojide Kullanım Alanları. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics*, 4 (1), 72-80.
- Van Hagen MAE, Ducro BJ, Broek JVD, Knol BW, 2005: Incidence, risk factors, and heritability estimates of hind limb lameness caused by hip dysplasia in a birth cohort of boxers. *Am. J. Vet. Res*, 66, 307-312.
- Yates D, Leedham R, 2019: Prepubertal neutering in cats and dogs. *In Practice*, 41 (7), 285-298.

## 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.)*

