



Official Publication of
The Afyon Kocatepe University
Faculty of Veterinary Medicine

K o c a t e p e Veterinary Journal

2023, 16(1), March



ISSN: 1308-1594
e-ISSN: 2147-6853

<https://dergipark.org.tr/kvj>

DergiPark
AKADEMİK

ADVISORY BOARDS

Publisher

Prof. Dr. Turan CİVELEK
Dean
On behalf of Afyon Kocatepe University
Faculty of Veterinary Medicine
Afyonkarahisar - TURKEY

Editor in Chief

Prof. Dr. Musa KORKMAZ

Editors

Assoc. Prof. Dr. Recep KARA
Assoc. Prof. Dr. Deniz YENİ

Assist. Editors

Assoc. Prof. Dr. Muhammed Enes İNANÇ
Assoc. Prof. Dr. Ruhi TÜRKMEN
Dr. Özlem GÜCÜYENER HACAN
Dr. Özlem ÖZDEN AKKAYA

Section Editors

Prof. Dr. Alpaslan YILDIRIM
Prof. Dr. Sadullah BAHAR
Prof. Dr. Akın YAKAN
Prof. Dr. Kemal Kaan TEKİNŞEN
Assoc. Prof. Dr. Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU

Foreign Language Editor

Prof. Dr. İbrahim DEMİRKAN
Assoc. Prof. Dr. Ulaş ACARÖZ

Statistics Editors

Prof. Dr. İbrahim KILIÇ
Assoc. Prof. Dr. İlkey DOĞAN

Organising Committee

Prof. Dr. Fatih FİDAN
Prof. Dr. Metin ERDOĞAN
Assoc. Prof. Dr. Mustafa KABU
Assoc. Prof. Dr. Fatih AVDATEK
Dr. Barış DENK
Dr. Ümit ÖZÇINAR
Research Assist. Murat KIRIKKULAK
Research Assist. Hülya ATİK
Research Assist. Beste SARAÇOĞLU
Research Assist. Eda DEMİRTAŞ

Prof. Dr. Arif Altıntaş
Ankara University -Turkey
Prof. Dr. Atilla Şimşek
Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. Cevdet Uğuz
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Yavuz O. Birdane
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. İbrahim Demirkan
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. İlhami Çelik
Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. İsmail Bayram
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Abdullah Kaya
Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. Mustafa Alişarlı
Ondokuz Mayıs University-Turkey
Prof. Dr. Nalan Bayşu Sözbilir
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Recep Aslan
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Seyfullah Haliloğlu
Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. Zafer Karaer
Ankara University-Turkey
Prof. Dr. Zehra Bozkurt
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. İbrahim Taşal
Mehmet Akif Ersoy University-Turkey
Prof. Dr. Şule Kaya
Mehmet Akif Ersoy University-Turkey
Prof. Dr. Korhan Altunbaş
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Aysun Demirkan
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Hasan Çiçek
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Fatih M. Birdane
Afyon Kocatepe University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. Süleyman Aypak
Adnan Menderes University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. Oktay Yılmaz
Afyon Kocatepe University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. İbrahim Kılıç
Afyon Kocatepe University-Turkey
Assist. Prof. Dr. M. Fatih Bozkurt
Afyon Kocatepe University-Turkey

Kocatepe Veterinary Journal is International an Peer-Reviewed Journal and published four times a year.

Kocatepe Veterinary Journal;

indexed in TUBİTAK-ULAKBİM TR-Dizin, Turkey Citation Index, CAB Abstract, CrossRef, Google Scholar

Addressed:

Kocatepe Veterinary Journal, Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, 03200, Afyonkarahisar, TURKEY.

Tel: +90 272 214 9309 Fax: +90 272 214 9309 E-mail: kvj@aku.edu.tr

www.kvj.aku.edu.tr

<http://dergipark.gov.tr/kvj>

Only accepts online submission

Kocatepe Veterinary Journal
2023 March 16/1

Official Publication of
The Afyon Kocatepe University

ISSN: 1308-1594 e-ISSN: 2147-6853

The Reviewer List (in alphabetical order)

Akın Yakan	Hatay Mustafa Kemal University
Ali Yiğit	Kafkas University
Aytaç Ünsal	Ankara University
Burhanettin Bekir Yağcı	Kırıkkale University
Canberk Balıkçı	Harran University
Cemalettin Ayvazoğlu	Ardahan University
Cengiz Gökbulut	Balıkesir University
Erdoğan Uzlu	Balıkesir University
Hasan Erdoğan	Aydın Adnan Menderes University
Hidayet Metin Erdoğan	Aksaray University
İlker Şimşek	Çankırı Karatekin University
İsmail Demircioğlu	Harran University
Mehmet Aydın Akalan	Afyon Kocatepe University
Mehmet Çağrı Karakurum	Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Mehmet Levent Özdüven	Namık Kemal University
Musa Tatar	Kastamonu University
Mustafa Yipel	Hatay Mustafa Kemal University
Onur Basbug	Sivas Cumhuriyet University
Osman Karabulut	Aksaray University
Özay Güleş	Afyon Kocatepe University
Sibel Alapala Demirhan	Uşak University
Tuncay Tufan	Siirt University
Vehbi Güneş	Erciyes University

RESEARCH ARTICLES

Emergent Contaminants in Freshwater Ecosystem: A case study from Turkey (<i>Tatlısu Ekosisteminde Endişe Yaratan Kirlenmeler: Türkiye'den Bir Vaka Çalışması</i>) Ayhan FİLAZİ, Özgür KUZUKIRAN, Gülçin AKCA, Begüm YURDAKÖK DİKMEN, Selin ÖZKAN KOTİLOĞLU, Mahmut SELVİ, Figen ERKOÇ	1-15
Short-Term Rectal Enema Probiotic Treatment with Intestinal Microbiota Analysis in Cats with Chronic Enteropathy (<i>Kronik Enteropatili Kedilerde Bağırsak Mikrobiyota Analizleri ile Kısa Dönem Rektal Enema Probiyotik Sağaltımı</i>) Kerem URAL, Hasan ERDOĞAN, Songül ERDOĞAN, Serdar PAŞA, Tuğba ASLAN, Cansu BALIKÇI, Gamze GÖKÇAY	16-30
The Effect of Clinoptilolite (Zeolite) Administration on Abomasal Emptying Rate in Calves (<i>Buzağularda Klinoptilolit (Zeolit) Uygulamasının Abomazal Boşalma Oranına Etkisi</i>) Abdurrahman Kürşat ÖZSOY, Tahir ÖZALP, Hasan ERDOĞAN	31-37
The Effects of Supplemental Rumen Protected Lysine and Methionine on Some Metabolic Parameters in Holstein Heirs During Late Pregnancy (<i>Gebeliğin Son Dönemindeki Holştayn Diüvelerde Rasyona Rumen Korunmalı Lizin Ve Metiyonin İlavetinin Bazı Metabolik Parametreler Üzerine Etkileri</i>) Özge ÇAKMAK, Hande İşıl AKBAĞ, Cangir UYARLAR	38-46
The Effects of In Ovo Administered Monosodium Glutamate on the Embryonic Development of Skeletal Muscle in Chickens (<i>Yumurta Verilen Monosodyum Glutamatın Tavuklarda İskelet Kasının Embriyonik Gelişimi Üzerine Etkileri</i>) Ferhan BÖLÜKBAŞ	47-56
Impact of Farm-Scale on Animal Management Practices in Pırlak Sheep Enterprises (<i>Pırlak Koyunculuk İşletmelerinde İşletme Büyüklüğünün Hayvan Yönetimi Uygulamalarına Etkisi</i>) Zehra BOZKURT, Özlem GÜCÜYENER HACAN, Serdar KOÇAK, Koray ÇELİKELOĞLU, Mustafa TEKERLİ, Metin ERDOĞAN	57-69
Investigation of Microbiological Quality Parameters of Packaged and Unpackaged Ice Cream Samples Offered for Sale in Afyonkarahisar (<i>Afyonkarahisar'da Tüketime Sunulan Ambalajlı ve Ambalajsız Dondurma Örneklerinin Mikrobiyolojik Kalite Parametrelerinin Araştırılması</i>) Ulaş ACARÖZ, Recep KARA, Zeki GÜRLER, Ali SOYLU, Nurtaç KÜÇÜKBÜĞRÜ	70-76
Differential Diagnostic Value of Serum Procalcitonin and Iron Levels in Diarrheic Neonatal Calves Caused by Escherichia coli and Rotavirus (<i>Escherichia coli ve Rotavirus Kaynaklı İshalli Neonatal Buzağularda Serum Prokalsitonin ve Demir Düzeylerinin Ayırıcı Tanı Değeri</i>) Şükrü DEĞİRMENÇAY, M. Sertaç EROĞLU, Emre EREN	77-85
Geometric Morphometric Analysis of Skull in Honamlı, Hair, Kilis and Saanen Goat Using Dorsal Landmarks (<i>Honamlı, Kıl, Kilis ve Saanen Keçilerinde Kafatasının Dorsal Landmarklar Kullanarak Geometrik Morfometrik Analizi</i>) Ahmet YAPRAK, Yasin DEMİRASLAN, Özcan ÖZGEL	86-92
A Study on Evaluation of the Offprint Titled "Is glanders disease treatable? Is it possible to supply and apply vaccines and serum for glanders?" (<i>"Ruam Kâbil-i Tedavi midir? Ruama Karşı Aşı ve Serum İstibzar ve Tatbiki Mümkün müdür?" Başlıklı Ayrı Basımın Değerlendirilmesi Üzerine Bir Araştırma</i>) Abdullah KARA, Erhan YÜKSEL, Özlem YÜKSEL, Mustafa ÇAVDAROĞLU	93-108
Serum Levels of Mid-Regional Pro-Adrenomedullin and Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells in Cattle with Pneumonia (<i>Pnömoni Sığırlarda Miyeloid Hücrelerde Ekspres Edilen Mid-regional Pro-Adrenomedullin ve Soluble Tetikleyici Reseptörün Serum Düzeyleri</i>) Mert SEZER, Enes AKYÜZ, Oğuz MERHAN, Uğur AYDIN, Yusuf Umut BATI, Uğur YILDIZ, Tahir GEZER, Ekin Emre ERKILIÇ, Ali Haydar KIRMIZIGÜL, Gürbüz GÖKÇE	109-117
CASE REPORTS	
A Case of Thoracic Spondylosis Deformance in a Boxer Dog (<i>Bir Boxer Irkı Köpekte Torakal Spondilozis Deformans Olgusu</i>) Zülfükar Kadir SARITAŞ, Zehra YAŞAR, Fatma GÖRÜCÜ, Yusuf KOÇ, Musa KORKMAZ, Musa YILMAZ	118-121
A Case of Myiasis in a Biting Wound in a Red Fox (Vulpes vulpes) (<i>Bir Kızıl Tilke (Vulpes vulpes) Isırılma Yarasında Myiazis Olgusu</i>) Zülfükar Kadir SARITAŞ, Emine Hesna KANDIR, Fatma GÖRÜCÜ, Yusuf KOÇ, Beste SARAÇOĞLU	122-126

Emergent Contaminants in Freshwater Ecosystem: A case study from Turkey

Ayhan FİLAZİ¹, Özgür KUZUKIRAN², Gülçin AKÇA³, Begüm YURDAKÖK DİKMEN¹, Selin ÖZKAN KOTİLOĞLU^{4*}, Mahmut SELVİ⁵, Figen ERKOÇ^{6†}

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, Türkiye

²Department of Veterinary Laboratory, Eldivan Vocational School of Health Services, Çankırı Karatekin University, Çankırı, Türkiye

³Department of Medical Microbiology, Faculty of Dentistry, Gazî University, Ankara, Türkiye

⁴Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Arts and Sciences, Karşehir Abi Evran University, Karşehir, Türkiye

⁵Department of Science Education, Gazî Faculty of Education, Gazî University, Ankara, Türkiye

⁶Department of Biology Education, Gazî Faculty of Education, Gazî University, Ankara, Türkiye

†Present address: Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Başkent University, Ankara, Türkiye

ABSTRACT

The current study evaluated certain emerging contaminants in the Susurluk sub-basin, an area under significant anthropogenic pollution pressure. Polychlorinated biphenyls (PCBs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), organochlorine insecticides, and microplastics were investigated both from surface and sediment samples collected in dry and wet seasons. γ -HCH and β -HCH were detected in the dry season from Kocaçay River reaching the Marmara Sea. Dieldrin concentrations were also very high in river sediments during the dry season. Nilüfer Stream is a significant waterway close to industrial and urban areas and under impact of pollution due to high concentrations of PCBs, DDT, and its' metabolites. Sediment samples contained higher levels of contaminants: DDT and metabolites were found in sediments from almost all stations. According to the Hazard quotient coefficient, all detected pollutants were found to be >1 , indicating a high risk in the river system. Fiber was the dominant microplastic. The water quality of Nilüfer Stream was poor/bad in quality both in dry and wet seasons, while Kocaçay River was moderate and poor/bad quality in dry and wet seasons, respectively. The findings of bacterial growth augmented and worsened water quality in the river basin with coliforms dominating, as assessed at the genus/species level and were very abundant.

Keywords: Aquatic Contaminants, Fecal coliform, Microplastics, POPs, Susurluk Basin, Water quality

Tatlısu Ekosisteminde Endişe Yaratan Kirleticiler: Türkiye'den Bir Vaka Çalışması

ÖZ

Bu çalışma, önemli antropojenik kirlilik baskısı altındaki bir alan olan Susurluk alt havzasında ortaya çıkan bazı endişe yaratan kirleticiler değerlendirmiştir. Kurak ve yağışlı mevsimlerde toplanan yüzey ve sediman örneklerinde poliklorlu bifeniller (PCBler), polibromlu bifeniller difenil eterler (PBDEler), organoklorlu insektisitler ve mikroplastikler araştırılmıştır. γ -HCH and β -HCH, Kocaçay Nehri'nin Marmara Denizi'ne dökülen bölgesinde kurak mevsimde tespit edilmiştir. Dieldrin konsantrasyonları da kurak mevsim boyunca nehir sedimanlarında çok yüksektir. Nilüfer çayı endüstriyel ve kentsel alanlara yakın olan önemli bir su yoludur ve yüksek konsantrasyondaki PCBler, DDT ve metabolitleri nedeniyle kirlilik etkisi altındadır. Sediman örnekleri daha yüksek seviyede kirletici içermektedir: DDT ve metabolitleri neredeyse tüm istasyonlardan alınan sediman örneklerinde bulunmuştur. Tehlike oranı katsayısına (Hazard Quotient) göre tesbit edilen tüm kirleticiler >1 olarak bulunmuş ve bu da nehir sisteminde yüksek risk olduğunu göstermiştir. Mikroplastikler içinde fiber en baskın olanıdır. Nilüfer Çayı'nın su kalitesi hem kurak hem de yağışlı sezonda kötü iken, Kocaçay Nehri'nin su kalitesi kurak mevsimde orta ve yağışlı mevsimde kötüdür. Cins/tür düzeyinde değerlendirildiğinde koliformların hakim olduğu ve çok miktarda olan bakteriyel büyüme bulguları da nehir havzasındaki su kalitesini kötüleştirmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fekal koliform, Kalıcı organik kirleticiler, Mikroplastikler, Su kalitesi, Sucul kirleticiler, Susurluk Havzası

To cite this article: Filazî A, Kuzukıran Ö, Akça G, Yurdakök Dikmen B, Özkan Kotiloğlu S, Selvi M, Erkoç F. Emergent Contaminants in Freshwater Ecosystem: A case study from Turkey. Kocatepe Vet J. (2023):16(1):1-15

Submission: 02.11.2022 Accepted: 10.01.2023 Published Online: 26.01.2023

ORCID ID; AF: 0000-0002-2800-6215, ÖK: 0000-0001-9294-2801, GA: 0000-0002-8877-4144, BYD: 0000-0002-0385-3602, SÖK: 0000-0002-2262-5613, MS: 0000-0002-9704-1591, FE: 0000-0003-0658-2243

*Corresponding author e-mail: selin.ozkan@ahievran.edu.tr

INTRODUCTION

Since the 1970s, regulation and investigation of harmful compounds in the surroundings have been well established; however, emerging contaminants (ECs) have recently raised concern. ECs are synthetic or natural pollutants, mainly chemicals or any microorganism in the surroundings with potentially known or suspected adverse ecological and health effects. ECs are found in materials (pharmaceuticals, personal care products, artificial sweeteners, plasticizers, surfactants, food additives, disinfection by-products, fire retardants, fertilizers and petroleum contaminants, wood preservatives, antifoulants, laundry detergents, etc.) in almost any household products and the environment. Their continuous release in very low quantities and presence in mixtures (the “cocktail effect”) to the receiving media impact animal and human health, adversely affect ecosystems and their services, cause acute and chronic toxicity, endocrine disruption (Tang et al. 2020), expand/increase vector borne diseases and bacterial pathogen resistance (Vaz 2018, Chaturvedi et al. 2021, Kasonga et al. 2021, Vieira et al. 2021). Recently, microplastics are also considered as one of the risky ECs in freshwater and marine aquatic ecosystems (Wagner and Lampert 2018). These pollutants are either intentionally or unintentionally discharged into the freshwater ecosystems causing harmful effects (Wilkinson et al. 2017) such as the decline in macroinvertebrate diversity (Muñoz et al. 2009), and behavioral changes in various aquatic organisms (Henry and Black 2008). Despite advanced analytical methods enabling pollutant identification over the past century, the extensive presence of these contaminants is yet to be fully understood so that standardized methods can be elaborated for sustainable mitigation (Sharma et al. 2009, González et al. 2012). Polychlorinated biphenyls (PCBs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), and organochlorine pesticides (OCPs) are considered Persistent organic pollutants (POPs). These synthetic anthropogenic substances are resistant to the degradation in ecosystems, and eventually are detrimental to human health (Paumo et al. 2020). PCBs have been widely used in the construction of insulators, heat-resistant fluids, machine oils, plastics, paints, flame retardants, and adhesives. Likewise, OCPs have been used widely in the past to control pests in agricultural crops and vector-borne diseases (Milun et al. 2016). The PBDEs are used in a variety of products, including building materials, television, domestic utensils, motor vehicle, airplanes, plastic materials, and textiles for their flame-retardant properties (Wu et al. 2020). The biological and chemical degradation of these compounds are limited and their apolar characteristics enable residual presence as particulate matter in lipid-rich tissues of aquatic organisms, water, and sediments. Due to their bioaccumulation potential

impact on aquatic food commodities and the food chain raise concern. Furthermore, toxicity concerns have restricted production and prohibited use since exposure to organic chlorine compounds cause harmful effects on health and the surroundings (Gray 2002). However, due to the illegal use of these substances or their long-term preservation, their presence in the environment can be seen, albeit rarely. Worldwide water is recognized as the most important resource for the persistence of life. Nevertheless, freshwaters are directly threatened by human actions. Presently, it is estimated that although industrialization increases welfare level, it causes an increase in ECs that cause potential harm to the surroundings and public health (Naushad 2014, Verhaert et al. 2017). All over the World, environmental legislation, directives and watch lists have been documented in order to control EC contamination in ecosystems (e.g. EPA and EU guidelines).

However, in contrast to ongoing monitoring efforts in North America and Europe, there has been limited monitoring practices in surface waters for emergent contaminants in Turkey. Furthermore, the studies regarding the emerging pollutants in river systems mainly focused on surface water while river sediments were neglected (Fairbairn et al. 2016, Battaglin et al. 2018). Thus, the aim of the current work is to estimate the presence of emerging contaminants in a river basin located in close proximity to a highly populated and industrialized urban area in Turkey. Considering the importance of freshwater systems being a small proportion in the water balance of water, evaluation of emerging contaminants is extremely vital for the region.

MATERIAL AND METHODS

Study Area and Sampling

Study area were located in the Susurluk sub-basin, an alluvial bottomland in Bursa, Turkey (Fig 1). We selected three stations from Kocaya River which reach Marmara Sea and two stations from Nilüfer Stream. Both pass through the center of an industrial and agricultural production region in Bursa. The study area is densely populated (about 3 million). Furthermore, Nilüfer Stream is heavily impacted by several sectors such as textile, plastics, automotive and drains to Kocaya River.

Samplings were done during the dry season (July 2019) and the rainy season (October 2020). Water samples for organic contaminants were gathered by stainless steel water spoon approximately of 50 cm depth and transferred to 100 mL glass bottles. Sediment samples were gathered by stainless steel Ekman-Birge grab and put to 100 mL glass bottles, both were covered by aluminum foil to avoid light effects and kept cool until analysis at the laboratory. From the collected water and sediment samples, we also took subsamples for fecal coliform analysis of the sites. The microbial samples

were put into sterilized 500 mL bottles. Microplastics were sampled with a flowmeter attached to 330 μm mesh-sized neuston nets (0.25 m high and 0.45 m wide rectangular). Each sampling was towed from the water surface and the debris were rinsed into a 1 L glass jars. Samples for measurement of water quality parameters (anions and cations) were also collected separately from the water surface into 1 L polypropylene bottles. Some physicochemical parameters such as Water temperature (WTemp), dissolved oxygen (DO), salinity (Sal), conductivity (EC), total dissolved solids (TDS), pH, were also measured by YSI multiprobe (Professional Plus®, Yellow Springs, Ohio, USA) in situ. The instrument sensors were calibrated before

every sampling according to the manufacturer's specifications and recommendations (APHA, 1998). All samples were transported to the lab in cool chain before processing.

Laboratory process: Organic Contaminants

Standards and Reagents

The analytical standards and reagents used in the work and their sources are given in Table 1. Standard stock solutions (100 $\mu\text{g}/\text{L}$ of each target analyte in mixture form) or internal standards were solved in acetonitrile and saved at 4-5°C in dark, until use. Working standards were prepared fresh.

Table 1. The analytical standards and reagents used in the study and their sources

Standards and Reagents	Source
<i>Polychlorinated Biphenyls (PCBs)</i>	
Indicator PCBs (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153, PCB 180)	Dr Ehrenstorfer Laboratories (Augsburg, Germany)
PCB 118 (dioxin like PCB)	Dr Ehrenstorfer Laboratories (Augsburg, Germany)
<i>Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)</i>	
PBDE 17, PBDE 47, PBDE 66, PBDE 100, PBDE 153, PBDE 183, PBDE209 (Mix standard in 74% nonane/26% toluene)	Wellington Laboratories (Guelph, Canada)
<i>Organochlorine insecticides</i>	
Alfa-hexachlorocyclohexane (α -HCH), Beta-hexachlorocyclohexane (β -HCH), Gamma-hexachlorocyclohexane (γ -HCH, lindan), Hexachlorobenzene (HCB), Dieldrin, Heptachlor, 4,4'-Dichlorodiphenyl dichloroethane (4,4'-DDD), 4,4'-Dichlorodiphenyldichloroethylene (4,4'- DDE), 4,4'-Dichlorodiphenyl trichloroethane (4,4'- DDT), 2,4'-Dichlorodipheyl trichloroethane (2,4'- DDT)	Dr Ehrenstorfer Laboratories (Augsburg, Germany).
<i>Internal standards</i>	
PCB 30 and PCB 209	Dr Ehrenstorfer Laboratories (Augsburg, Germany)
2,2',4,4',5,5' hexachlorobiphenyl (PCB153-labeled $^{13}\text{C}_{12}$)	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA)
<i>Reagents</i>	
C18, florisil (60-100 mesh), magnesium sulfate, and Bondesil-Primary Secondary Amine (PSA) (40 μm) for solid-phase extraction (SPE)	Agilent Technologies (Santa Clara, California USA)
<i>Solutions (in analytical grade)</i>	
Acetonitrile, n-hexane, dichloromethane, toluene, and isooctane	Merck (Darmstadt, Germany).
Certified mono element standard solution	Merck (Darmstadt, Germany).

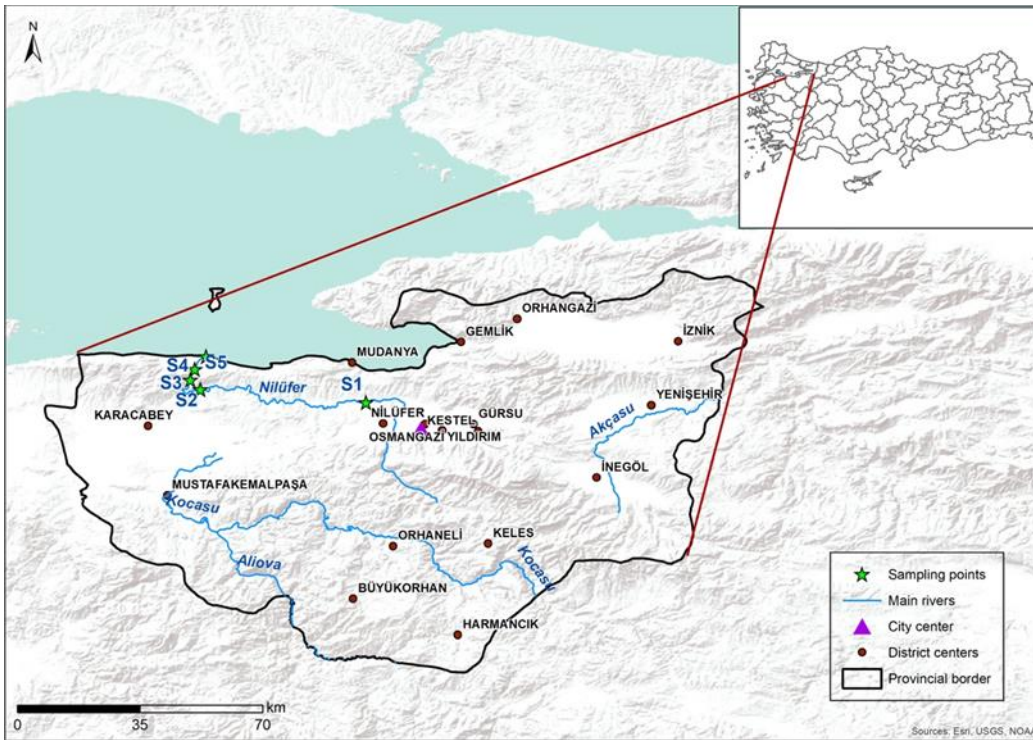


Fig 1: Study sites

Analysis of persistent organic pollutants

Extraction of water and sediments were carried out using the method of Kuzukiran et al. (2016). Sediments were dried at room temperature for 24 h, and water samples were processed within 24 h after collection. Water samples were used without further filtration. Analytical separations were carried out with Gas chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) (Thermo Finnigan, San Joe, CA, USA). The extraction method, working instrumental properties, and method validation are given in detail in the study by Kuzukiran et al. (2016).

Laboratory process: Ion chromatography Analysis

Anions and cations analysis were performed by Shimadzu LC 20AD system (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japan) with conductivity detector (CDD-10A SP). Anions and cations were run through Shim-pack IC SA3 and Shim-pack IC-SC1 column, respectively. The mobile phases for anions and cations were 3.6 mM sodium carbonate and 3.5 mM sulfuric acid, respectively. A certified mono element standard solution was used for the accuracy and calibration of the instrument. For each analyte, LOD and LOQ were assessed by the signal-to-noise ratio (S/N, 3/10) (Meng et al. 2008, Roy et al. 2011).

Laboratory process: Fecal coliforms

Water samples (50 mL) were vigorously vortexed and filtered from 0.45 μm pore-sized cellulose membranes under a vacuum (Rice et al. 2012). In order to identify the total and fecal coliform bacteria including *Escherichia coli* as well as the thermotolerant

coliforms, following the filtration process, samples were put onto chromogenic coliform agar and chromogenic *E. coli* agar, the eosin-methylene-blue (EMB) agar, R2A agar and mFC agar (MM747B; Oxoid Australia) to be incubated at $34 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for 24-72 hours. Blue to blue/grey appearance with 1–3 mm in diameter, and colonies which could be flat, raised, or mucoid were defined as thermotolerant coliforms (including *E. coli*). Later, selected isolates were subcultured into EC-MUG broth (CM0979; Oxoid, Australia) using Durham tubes. After incubation at $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for 21 ± 3 h, isolates that generated gas and turbidity or fluoresced under long-wave UV light (about 360 nm) were identified as thermotolerant coliforms, while isolates that fluoresced were identified as *E. coli*.

The same procedures were applied to the one g weighted sediment samples. Then one mL sterile distilled water was added to the sediment samples. After vigorous vortexing, the same filtering procedures were carried out. Serial dilutions of 10^{-1} , 10^{-2} , and 10^{-3} allowed enumeration of high bacterial counts. Then, a 100 μL sample was poured onto selective agar media to identify total and fecal coliforms. The filters were placed onto EMB agar, Lactose-based membrane fecal coliform (mFC, Merck, Germany) agar, Chromocult *Enterobacter Sakazakii* agar, chromogenic *E. coli* agar and incubated at $34 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for 24-48 h and at $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for isolation and identification of the thermotolerant coliforms (Wohlsen 2011). The growing purple/blue colonies were verified as *E. coli* with total number of the purple/blue and pink colonies defined as thermotolerant coliforms. Further confirmation was by using conventional microbiological methods such as triple-sugar-iron

(TSI), Simmons's citrate, urea, and indole media (IMVIC tests). Further on, the selected colonies were inoculated into EC-MUG broth. The number of *E. coli* in water was assessed as colony forming units (CFU)/100 mL = number of purple colonies/volumes of filtered sample (100 mL) × dilution factor. Total coliform bacteria count in water was assessed as CFU/100 mL = number of all other coliforms except *E. coli* colonies/volume of filtered sample (100 mL) × dilution factor. For unidentified specimens, a single colony passage was taken, and typing was established with MALDI-TOF automatic system to identify the *E. coli* strains.

Laboratory process: Microplastics

Microplastic (MP) samples were sieved to remove larger organic and plastic particles. Wet peroxidation method was followed (Masura et al., 2015) for organic material removal by applying 0.05 M Fe (II) solution and 30% hydrogen peroxide to each sample. The solutions were then heated to 50°C for 30 min and then vacuum filtered through GF/C Whatman filters (pore size of 0.45 µm) using stainless steel filter. The MP samples were classified as fiber, fragment, film, foam, and microbead under a Carl ZeissTMStemiTMDV4 Series Stereo microscope following the instructions and protocol of Hidalgo-Ruz et al. (2012). To identify the chemical composition of the MPs, Thermo Scientific Nicolet 6700 Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometer with Attenuated Total Reflection (ATR) attachment was used. All spectra were collected within the range from 4000 to 400 cm⁻¹ at a resolution of 4.0 cm⁻¹. Evaluation of FT-IR spectra was performed by comparing reference spectral library database matches, and manual interpretation of absorption peaks were performed to validate polymer type.

Risk assessment

In order to evaluate the risk of studied contaminants to the water surrounding, hazard quotients (HQs) were used, calculated by dividing the maximum measured environmental concentration (MEC) by a predicted no-effect concentration (PNEC) (HQs=MEC/PNEC). PNEC values were taken from Metelkova et al. (2019), Verbruggen and Brand (2015), Zeng et al. (2018). Three risk levels were classified according to the HQs: HQ < 0.1, low risk; 0.1 ≤ HQ ≤ 1, medium risk; and HQ > 1, high risk.

Data analysis

To explore the effects of seasons (dry-wet) and sites (Nilüfer stream-Kocacay River), we performed two-way analysis of variance (ANOVA) using R (version 4.0.3). If there were statistically significant differences observed in water quality parameters, Tukey Post-doc test for pairwise comparisons was conducted. Interaction plots were used to visualize the results. An interaction where the lines cross represents

antagonistic interactions while parallel lines indicate the absence of interaction.

RESULTS AND DISCUSSION

LOD and LOQ values for OCPs, PCBs, and PBDEs as selected ECs, calculated in water samples were 0.18-0.27 and 0.55-0.83 µg/L, 0.19-0.23 and 0.58-0.68 µg/L, 0.15-0.28 and 0.44-0.85 µg/L, respectively (Table 2). In the sediment samples, LOD and LOQ values were 1.55-1.83 and 3.41-6.4 µg/kg, 0.77-2.05 and 2.29-6.16 µg/kg, 1.04-2.10 and 3.11-6.65 µg/kg, respectively (Table 3). The LOD and LOQ values of anions and cations are shown in Table 4. The validated method and appropriate results were attained (European Commission, 2020).

While no target analytes were found in Nilüfer Stream water, gamma-HCH (lindane) and beta-HCH were detected in Kocacay River water only in the dry season. In fact, HCH has been banned in Turkey for almost 40 years. Among HCH isomers, beta-HCH is generally considered the most durable and relatively resistant to microbial degradation (Willett et al. 1998). However, the presence of beta-HCH in this region indicates present HCH use. In this case, it is thought that HCH residues may also be present in the sediment samples. However, in this study, HCH isomers were not found at the stations where the sediment samples were taken (Table 5). Sediment samples, on the other hand, contained more POPs. DDT and its metabolites were detected in the sediments taken from almost all stations. While dieldrin was detected in very high concentrations in Kocacay River sediments during the dry period, it was detected only in one station in Nilüfer Stream. DDT and its metabolites were found in higher concentrations in the wet period, especially in Nilüfer Stream sediments. PCBs were also detected in higher concentrations in sediments during the dry season (Table 5). These results show that the source of pollution in Kocacay River comes from sources other than Nilüfer Stream. The PNEC values used to determine the Hazard quotient were 0.029, 15.2, 12, 0.01, 0.09, 27, 0.046, and 62 µg/L for gamma-HCH, beta-HCH, dieldrin, 4,4-DDE, 4,4-DDD, 2,4 DDT, total PCBs, and total PBDEs, respectively (Metelkova et al. 2019, Verbruggen and Brand 2015, Zeng et al. 2018). Accordingly, the hazard quotient coefficient of all determined pollutants was >1 (Table 5). This situation is considered to be high risk. Because of their potential for harmful health effects in humans worldwide including endocrine disruption, reproduction, and cancer, POPs received increased attention and raised concern (Davidsen et al. 2021, Klaunig et al. 2020, Yurdakok et al. 2015). Microbiological results showed bacterial growth in all samples with quite a variety of culturable bacteria species. The coliform bacteria investigated in the study were dominant at the genus/species level and in high numbers. The total bacterial counts, coliform bacilli

count, and fecal coliforms detected in the samples were taken in two different seasons (dry-wet) and at two different temperatures (35°C-44°C). Samples were incubated at both incubation temperatures as planned in the study and grown colonies were calculated as CFU/100 mL after calculation with dilution factors (Table 6). There were no significant differences between water and sediment samples in terms of sampling locations for total bacteria and coliforms, while fecal coliforms were found higher in Nilüfer Stream than in Kocaçay (two-way ANOVA, $F_{1,28} = 4.78$, $P < 0.05$) because the Nilüfer Stream is in a location with high urban intensification and in a high-density residential urban area. Major pollution sources are anthropogenic, mostly human or animal wastes or sewage discharges. Besides, this area is contaminated by urban wastewater and industrial wastes. Therefore, according to our results, the analyzed data about high amounts of fecal coliforms in this region actually corresponds to our expectations per microbiological contamination/risks. In addition, water and sediment samples revealed that pollutants causing serious eutrophication and microbial contamination in the region have the potential to influence ecosystem functions via changing microbial community composition. No differences were found between the two sampling locations for total bacteria, but there was a significant difference between wet and dry seasons for total bacteria (two-way ANOVA, $F_{1,28} = 8.73$, $P < 0.01$), while no differences were observed for either coliform or fecal coliforms during both sampling seasons. Although there were two different growth temperatures for total bacteria, coliforms, and fecal coliforms, we could not find any significant difference in the type and abundance of microorganisms. However, fecal coliforms were found higher in sediments than in water (two-way ANOVA, $F_{1,28} = 85.36$, $P < 0.05$), but there were no significant differences in terms of different temperatures by means of thermotolerant strains. The proximity of sampling sites to highly populated urban areas may act as a significant risk to public health because of microbial pathogens, especially fecal coliforms. Therefore, it is very crucial to determine the bacterial loads due to fecal coliforms as well as total coliforms in such streams in the country.

According to the physicochemical analysis, NH_4 , PO_4 , SO_4 , Cl, Na, SS, TDS, EC, turbidity, and alkalinity values were higher in the Nilüfer Stream in both sampling periods. While, chl-a, NO_3 , and DO (mg/L) values were higher in the Kocaçay River in both sampling periods (Table 7). Two-way ANOVA results for these parameters showed highly significant differences ($P < 0.05$; $P < 0.001$). Water chemistry in rivers is controlled by different natural and anthropogenic processes such as rock weathering, atmospheric deposition, agricultural and industrial activities (Meybeck 2003, Qu et al. 2019, Yotova et al. 2021). However, especially direct discharge of domestic and industrial wastewater to river ecosystems

unequivocally causes water quality deprivation and public health problems (Üstün 2011). These problems are also observed in Nilüfer Stream with the increasing population of the city and increasing waste material; thus, the stream is exposed to intense organic and inorganic pollutants via wastewater discharge (Üstün 2011, Dorak and Çelik 2017). The Turkish Water Quality Classes are provided to determine pollution levels in surface waters in Turkey and it is very important from an EU perspective (Jin et al. 2013). According to the EU Water Frame Work Directive, all European members and candidate countries have to meet the water quality standards in river ecosystems. When our results are compared (DO, conductivity, ammonium, nitrate, and phosphate values) with standard values, they were higher than acceptable levels in both river systems. The physicochemical results showed that the river systems have poor water quality. Water quality indexes are the simple, functional, and favorable approach for elucidating the general quality of surface waters (Aydın et al. 2021). There are several indexes widely used for surface water quality categorization and The National Sanitation Foundation Water Quality Index (NSFWQI) is one of the most preferred indexes (Fathi et al. 2018, Noori et al. 2019). NSFWQI is based on nine parameters: temperature, total phosphate, nitrate, dissolved oxygen (%), total solids, biological oxygen demand, pH, and fecal coliform bacteria (Noori et al. 2019). The NSFWQI was calculated according to the WQI calculator developed by Water Research Center. Our water quality results have shown that Kocaçay River was moderate and of bad quality in dry and wet seasons, respectively (equal to 53 and 39, respectively). Nilüfer Stream was found in bad quality in both seasons with similar values (equal to 35 and 36, respectively). Indeed, the water quality classification could be worse than the calculated, since the absence of BOD and TP measurements are lacking (Noori et al. 2019). According to the two-way ANOVA results for each water quality parameter, the main effects were highly significant, while there is no significant interaction appeared except for turbidity, alkalinity, and Na (Table 7). The interaction plot of these variables showed significant differences between seasons and sites (Fig 3). Although turbidity showed variation between both seasons and sites, we have not depicted seasonal differences for chl-a and PO_4 values (Table 8, Fig 2).

During the sampling seasons, the most abundant microplastic type in both locations were fibers (Fig 3) and depicted as microscopy images Fig 4. Polymer compositions were mainly polyethylene (PE) (62.2%) and polypropylene (PP) (24.3%) according to the FT-IR spectral identification and interpretation (Fig 5). Remaining microplastics were identified as polystyrene (PS), poly (ethylene terephthalate) (PET), and poly (methyl meta-acrylate) (PMMA). On some PE and PP spectra, in the range of 1720-1710 cm^{-1} peaks are observed which could indicate thermo- and

photooxidation-related aging (Gardette et al. 2013). The findings are in an agreement with the global pattern for freshwater ecosystems that fibers were morphologically the most abundant microplastic type (Di and Wang 2018), whereas chemically polyethylene dominates (Mason et al. 2016). In the study sites, high

abundance would be due to fishing activities as well as the industrial and domestic waste discharges through highly populated urban areas. However, further detailed research is needed on microplastic pollution in freshwater ecosystems.

Table 2. Validation data of targeted organochlorine pesticides, polybrominated bipheyls and polibrominated biphenyl ethers in water.

Compound	Linearity ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Correlation coefficient (r^2)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Mean Recovery (%)	Repeatability (RSD%)	Intermediate precision (RSD%)
<i>Organochlorine pesticides (OCP)</i>							
α - HCH	1-100	0.996	0.21	0.63	94.5 \pm 4.8	8.3	8.2
β - HCH	1-100	0.994	0.22	0.66	101.2 \pm 6.3	8.1	5.8
Lindane	1-100	0.998	0.27	0.83	106.3 \pm 5.5	7.4	6.4
HCB	1-100	0.997	0.24	0.72	97.6 \pm 9.4	7.9	8.3
Heptachlor	1-100	0.998	0.26	0.78	96.7 \pm 7.7	7.3	6.1
Dieldrin	1-100	0.995	0.27	0.83	89.9 \pm 10.1	10.2	8.2
4,4'-DDD	1-100	0.997	0.22	0.68	97.3 \pm 8.3	10.4	9.3
4,4'-DDE	1-100	0.995	0.23	0.69	97.2 \pm 5.6	5.7	6.6
2,,4'- DDT	1-100	0.996	0.21	0.65	94.8 \pm 7.6	7.3	9.5
4,4'-DDT	1-100	0.998	0.18	0.55	103.4 \pm 5.2	7.6	8.7
Methoxychlor	1-100	0.999	0.22	0.67	98.6 \pm 9.8	5.9	5.2
<i>Polychlorinated Biphenyls (PCBs)</i>							
PCB28	1-100	0.998	0.19	0.58	101.4 \pm 8.1	5.1	4.7
PCB52	1-100	0.997	0.19	0.58	104.3 \pm 6.5	5.2	6.2
PCB101	1-100	0.999	0.19	0.58	99.8 \pm 7.4	5.8	6.4
PCB118	1-100	0.998	0.23	0.68	99.6 \pm 8.2	6.1	5.9
PCB153	1-100	0.999	0.21	0.64	98.7 \pm 5.2	3.9	4.3
PCB138	1-100	0.998	0.20	0.61	97.6 \pm 5.6	4.7	4.2
PCB180	1-100	0.998	0.23	0.68	97.4 \pm 8.8	6.3	6.5
<i>Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs)</i>							
PBDE 17	1-100	0.996	0.15	0.44	97.4 \pm 5.7	8.6	5.3
PBDE 47	1-100	0.994	0.18	0.54	97.5 \pm 5.8	7.3	4.6
PBDE 66	1-100	0.996	0.19	0.58	97.7 \pm 6.9	10.6	5.1
PBDE 100	1-100	0.999	0.19	0.57	92.5 \pm 7.7	5.5	3.1
PBDE 153	1-100	0.993	0.28	0.85	91.9 \pm 4.3	5.1	5.9
PBDE 183	1-100	0.995	0.28	0.85	89.7 \pm 10.2	12.5	9.1
PBDE 209	1-100	0.998	0.18	0.54	96.2 \pm 8.6	2.3	4.3

LOD: Limit of Detection, LOQ: Limit of Quantification; RSD: Relative Standard Deviation

Table 3. Validation data of targeted organochlorine pesticides, polybrominated bipheyls and polibrominated biphenyl ethers in sediments.

Compound	Linearity ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Correlation coefficient (r^2)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Mean Recovery (%)	Repeatability (RSD%)	Intermediate precision (RSD%)
<i>Organochlorine pesticides (OCP)</i>							
α -HCH	1-100	0.994	1.56	4.67	92.1 \pm 8.7	9.5	8.4
β -HCH	1-100	0.995	1.58	5.21	103.1 \pm 7.2	9.3	8.7
Lindane	1-100	0.993	1.57	5.17	107.2 \pm 7.5	8.4	7.6
HCB	1-100	0.997	1.61	5.31	93.3 \pm 8.5	7.8	6.9
Heptachlor	1-100	0.996	1.83	6.40	92.8 \pm 6.8	7.5	6.2
Dieldrin	1-100	0.997	1.55	3.41	88.9 \pm 10.8	9.6	9.7
4,4'-DDD	1-100	0.995	1.79	5.91	90.9 \pm 10.1	11.7	10.4
4,4'-DDE	1-100	0.995	1.56	5.15	85.9 \pm 9.9	11.4	9.9
2,,4'-DDT	1-100	0.995	1.65	5.45	91.4 \pm 9.6	8.5	9.3
4,4'-DDT	1-100	0.998	1.55	3.41	96.7 \pm 6.4	6.3	6.8
<i>Polychlorinated Biphenyls (PCBs)</i>							
PCB28	1-100	0.997	1.16	3.52	104.6 \pm 5.0	5.3	4.9
PCB52	1-100	0.998	1.18	3.55	106.8 \pm 5.7	5.7	5.5
PCB101	1-100	0.998	1.24	3.73	97.9 \pm 6.5	6.5	7.3
PCB118	1-100	0.997	0.99	3.00	98.6 \pm 6.1	5.6	6.2
PCB153	1-100	0.999	0.81	2.43	97.1 \pm 4.1	5.2	4.8
PCB138	1-100	0.999	0.77	2.29	97.5 \pm 4.7	4.1	3.6
PCB180	1-100	0.997	2.05	6.16	93.9 \pm 7.9	6.8	5.3
<i>Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs)</i>							
PBDE 17	1-100	0.995	1.04	3.11	93.4 \pm 7.8	9.2	8.1
PBDE 47	1-100	0.998	1.18	3.56	93.6 \pm 6.5	7.8	6.3
PBDE 66	1-100	0.998	1.20	3.61	95.4 \pm 9.2	9.7	9.7
PBDE 100	1-100	0.997	2.10	6.65	95.6 \pm 7.7	8.6	8.6
PBDE 153	1-100	0.996	1.16	3.47	94.1 \pm 6.1	7.3	7.3
PBDE 183	1-100	0.995	1.46	4.49	91.0 \pm 4.8	5.1	5.1
PBDE 209	1-100	0.997	1.30	3.89	92.5 \pm 3.9	4.9	4.9

LOD: Limit of Detection, LOQ: Limit of Quantification; RSD: Relative Standard Deviation

Table 4. LOQ and LOD (mg/L) values of anions and cations

Parameters	LOQ (mg/L)	LOD (mg/L)
F	0.053	0.017
Cl	0.066	0.022
NO ₂	0.148	0.049
NO ₃	0.215	0.071
ClO ₃	0.257	0.085
PO ₄	0.050	0.016
SO ₄	0.217	0.072
Na	0.009	0.003
NH ₄	0.027	0.009
K	0.026	0.008
Mg	0.084	0.028
Ca	0.105	0.035

Table 5. Detected concentration ranges of contaminants in sampling sites during dry and wet seasons, and Hazard Quotients (HQs) risk effect.

Environment	Compounds	Kocaçay River				Nilüfer Stream			
		Dry	HQ	Wet	HQ	Dry	HQ	Wet	HQ
Water (µg/L)	Gamma-HCH	<LOQ-126.0	4344	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	Beta-HCH	<LOQ-86.9	5.71	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	Dieldrin	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	4,4-DDE	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	4,4-DDD	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	2,4-DDT	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	PCB28	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	PCB118	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	PCB138	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	PCB153	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	PBDE28	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
	Sediment (µg/kg)	Gamma-HCH	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ
Beta-HCH		<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0
Dieldrin		1515.4-2120.3	176.69	<LOQ	0	<LOQ-220.6	18.38	<LOQ	0
4,4-DDE		<LOQ – 4.71	471	<LOQ-68.50	6.85	<LOQ-11.4	1140	38.8-91.1	9111
4,4-DDD		<LOQ	0	44.8-587.2	6524	<LOQ-32.6	362.23	<LOQ-280.4	3115
2,4-DDT		<LOQ-82.8	3.07	<LOQ	0	89.8-101.4	3.76	<LOQ	0
PCB28		<LOQ	-	<LOQ-631.0	-	<LOQ-251.1	-	<LOQ-49.6	-
PCB118		<LOQ-210.6	-	<LOQ	-	<LOQ-245.4	-	<LOQ	-
PCB138		<LOQ-47.9	-	<LOQ	-	29.9-34.6	-	<LOQ	-
PCB153		<LOQ	-	<LOQ	-	<LOQ-37.8	-	<LOQ	-
Total PCBs		<LOQ-258.5	5619	631.0	13717	<LOQ-568,9	12367	<LOQ-49.6	1078
PBDE28		<LOQ	0	<LOQ-194.7	3.14	<LOQ	0	<LOQ	0

HQ: Hazard Quotient, LOQ: Limit of quantification

Table 6. Numbers of coliform bacteria isolated during different seasons at two different temperatures.

Env.	Count (CFU/100 ml)	Kocaçay River				Nilüfer Stream			
		Dry		Wet		Dry		Wet	
		34°C	44°C	34°C	44°C	34°C	44°C	34°C	44°C
Water	Tot. bacteria	3.8x10 ⁶	4.8x10 ⁵	6.2x10 ⁹	5,8x10 ⁸	2.9x10 ⁶	2.4 x 10 ⁷	6.2x10 ⁹	1.9x10 ¹⁰
	Col. bacteria	2.1x10 ⁴	2.5x10 ⁵	2.8x10 ⁵	2.5x10 ⁴	2.2x10 ⁵	1.7x10 ⁵	8.7x10 ⁴	3.8x10 ⁵
	F. coliform	1.9x10 ²	0.5x10 ⁸	1.1x10 ³	1.2x10 ³	-	-	4.5x10 ²	9.6x10 ²
Sediment	Tot. bacteria	5x10 ⁶	2x10 ⁶	1.6x10 ¹⁰	3.8x10 ⁹	1.9x10 ⁶	2.8x10 ⁶	2.0x10 ¹⁰	1.3x10 ⁸
	Col. bacteria	5x10 ³	3.1x10 ⁴	8.3x10 ³	1.7x10 ⁵	2.1x10 ⁵	7.2x10 ⁵	5. 6x10 ³	2.4.10 ⁵
	F. coliform	2.6x10 ²	-	9.0x10 ²	1.4x10 ⁴	5.5x10 ²	0.5x10 ⁸	1.9x10 ²	5.5x10 ⁷

Tot. bacteria=Total bacterial count, Col. Bacteria=Coliform bacteria, F. coliform= Fecal coliform, Env.= environment.

Table 7. Range of physicochemical characteristics of sampling sites during different seasons.

Parameters	Kocaçay River		Nilüfer Stream	
	Dry	Wet	Dry	Wet
WTemp (°C)	26.6-28.8	18.2-19.6	26.0-27.4	19.4-21.9
DO (mg L ⁻¹)	5.4-6.5	1.3-2.2	0.6-3.0	0.4-0.6
DO (%)	73.6-88.5	14.5-23.7	5.1-38.9	4.3-7.1
EC (µS/cm)	1261-2152	925-1009.8	2048-2323	1982-2107
TDS (mg L ⁻¹)	819-1306.5	664.8-745.3	1274-1482	1371.5-1534.0
Sal (‰)	0.63-1.02	0.5-0.6	0.9-1.2	1.1-1.2
pH	8.4-8.5	8.1-8.2	7.6-8.1	8.15-8.30
Turbidity (NTU)	12.4-13.9	6.4-7.8	59.8-62.9	11.4-16.2
SS (µg L ⁻¹)	16.8-19.4	14.3-26.5	38.8-66.0	44.3-60.9
Chl <i>a</i> (µg L ⁻¹)	63.4-103.5	35.9-56.3	5.3-8.8	3.5-9.7
Alkalinity mg CaCO ₃ L ⁻¹	92-105	234-264	125-165	416-438
F (mg L ⁻¹)	0.2-0.2	0.12-0.26	0.16-0.22	0.23-0.29
Cl (mg L ⁻¹)	252.7-555.6	120.1-171.8	453.2-521.8	417.0-444.8
NO ₂ (mg L ⁻¹)	0.12-0.14	0.8-1.2	0.0-0.0	1.1-1.3
NO ₃ (mg L ⁻¹)	1.00-1.12	2.5-2.7	0.4-0.6	0.2-1.6
PO ₄ (mg L ⁻¹)	0.7-0.9	0.6-1.1	2.5-3.4	3.8-6.3
SO ₄ (mg L ⁻¹)	87-1-120.5	78.5-80.8	104.4-112.9	101.8-106.8
Na (mg L ⁻¹)	60.9-84.7	111.1-135.4	86.3-93.8	336.2-363.7
NH ₄ (mg L ⁻¹)	3.7-6.9	4.2-7.2	10.4-12.9	22.7-32.8
K (mg L ⁻¹)	9.3-14.3	10.2-16.5	13.3-15.3	17.0-39.1
Mg (mg L ⁻¹)	40.5-58.7	17.7-21.2	20.0-22.7	12.1-21.2
Ca (mg L ⁻¹)	53.5-59.9	34.4-34.6	66.4-67.0	44.5-53.7

Table 8. Summary of two-way ANOVA. Location: Season indicates the interaction effect of waterbody and season.

	<i>F</i> value	<i>p</i> -value	Sig-level		<i>F</i> value	<i>p</i> -value	Sig-level
Temp (°C)				Turbidity			
Season	127.197	<0.001	***	Season	423.2	<0.001	***
Location	0.429	0.53		Location	606.3	<0.001	***
Location:Season	4.125	0.08		Location:Season	346.2	<0.001	***
DO (µg^{L-1})				Chl a (µg^{L-1})			
Season	40.10	<0.001	***	Season	5.365	0.06	
Location	24.68	<0.01	**	Location	40.230	<0.001	***
Location:Season	10.72	<0.05	*	Location:Season	3.418	0.11	
EC (µS cm⁻¹)				Alkalinity			
Season	6.38	<0.05	*	Season	392.55	<0.001	***
Location	20.08	<0.01	**	Location	112.36	<0.001	***
Location:Season	2.03	0.2		Location:Season	37.99	<0.001	***
DIN (µg^{L-1})				Na (µg^{L-1})			
Season	21.82	<0.01	**	Season	265.8	<0.001	***
Location	47.70	<0.001	***	Location	210.2	<0.001	***
Location:Season	14.95	<0.01	**	Location:Season	146.5	<0.001	***
PO4 (µg^{L-1})				K (µg^{L-1})			
Season	2.803	0.14		Season	2.335	0.1	
Location	38.746	<0.001	***	Location	3.986	0.1	
Location:Season	4.017	0.1		Location:Season	1.829	0.3	
SO4 (µg^{L-1})				Ca (µg^{L-1})			
Season	3.412	0.1		Season	90.92	<0.001	***
Location	5.611	0.1		Location	3.986	<0.01	**
Location:Season	1.014	0.3		Location:Season	1.829	0.3	
Mg (µg^{L-1})				F (µg^{L-1})			
Season	20.39	<0.01	**	Season	4.69	0.1	
Location	11.66	<0.05	*	Location	0.36	0.6	
Location:Season	1.829	<0.05	*	Location:Season	1.34	0.3	
Cl (µg^{L-1})				NH₄ (µg^{L-1})			
Season	5.37	0.1		Season	10.54	<0.05	*
Location	9.87	<0.05	*	Location	45.92	<0.001	***
Location:Season	1.39	0.2		Location:Season	13.69	<0.05	*
NO₃ (µg^{L-1})				NO₂ (µg^{L-1})			
Season	15.8	<0.05	**	Season	141.59	<0.001	***
Location	16.31	<0.05	**	Location	0.45	0.5	
Location:Season	4.404	0.1		Location:Season	4.62	0.1	

Sig-level codes: * <0.05, ** <0.01, and *** < 0.001.

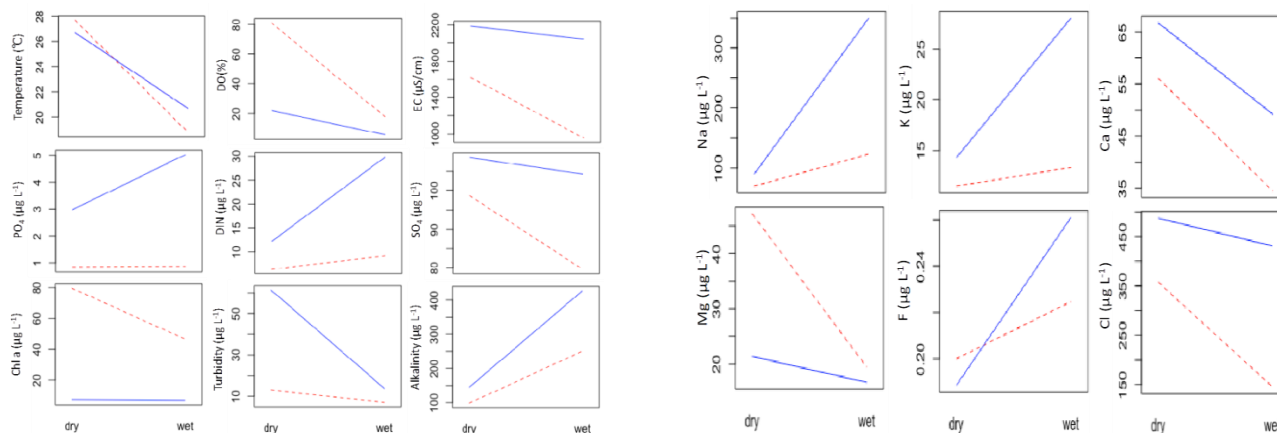


Fig 2: Two-way interaction plot of main physical and chemical parameters. Colors represent blue line: Nilüfer Stream, red dots: Kocaçay River, respectively.

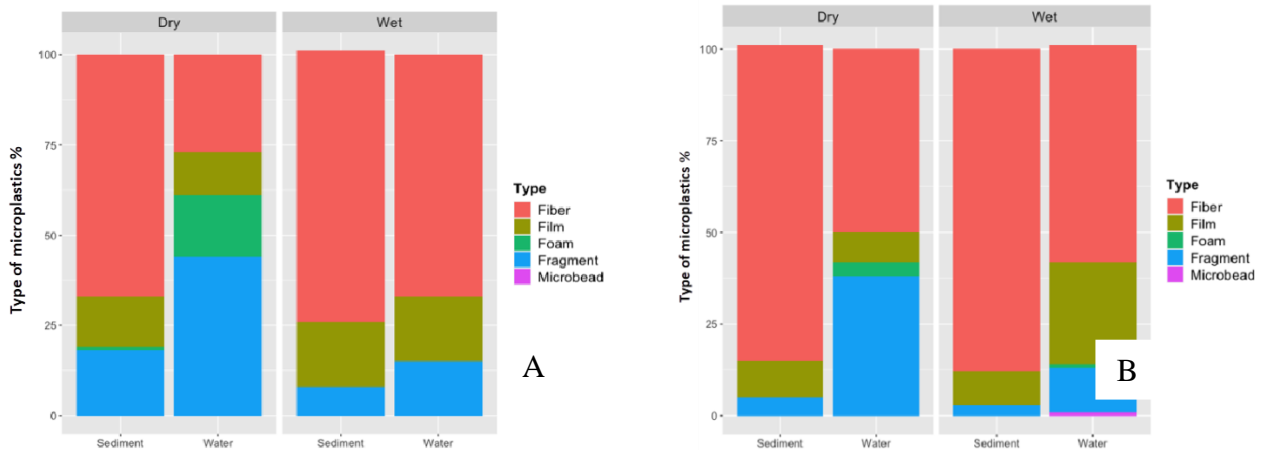


Fig 3: Observed percent distribution of microplastics in study sites: A) Kocaçay River, B) Nülüfer Stream.

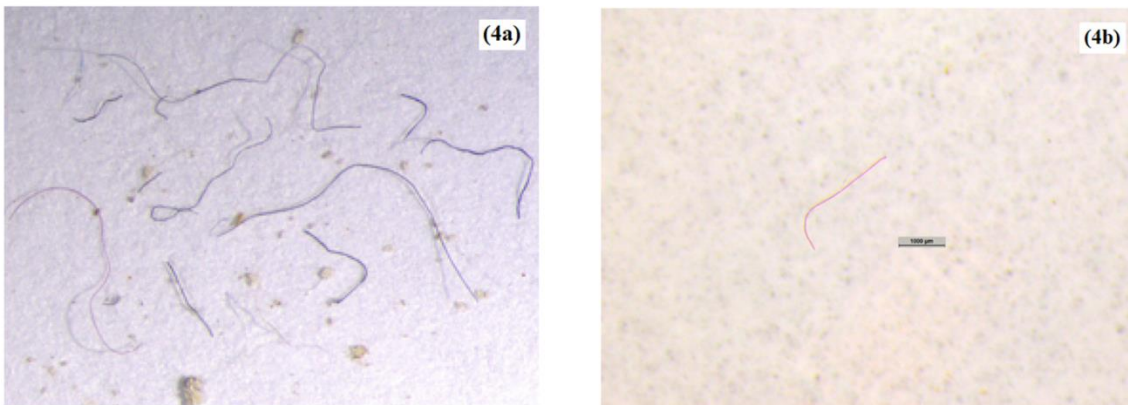


Fig 4a: General stereo microscopy image of fiber microplastics ($\times 3.2$ magnification). **4b:** High magnification and detail of microplastic fiber (bar: 100 μm). Carl Zeiss Stemi DV4 model stereo microscope (Photo: E. Paçal).

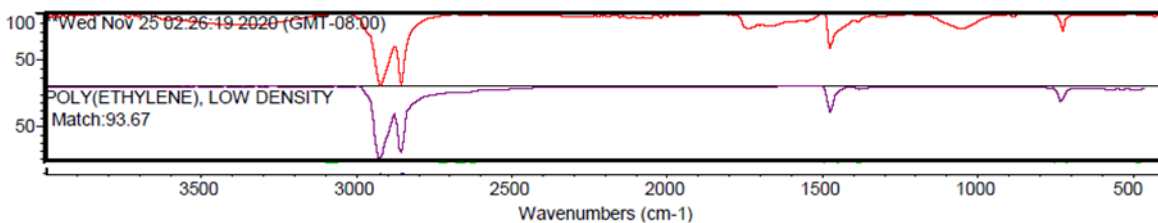


Fig 5: FT-IR spectral identification and interpretation of Kocaçay River microplastic polyethylene (PE) sample.

CONCLUSION

The best risk management methods and policies require thorough research, filling in the gaps in scientific knowledge, and comprehending EC existence, behavior in water sources and wastewater along with paths and accumulation in the surrounding. The present study provides important data for relevant authorities for further actions to be planned, managed and executed. The other significant issue is EC not being regulated using legislation in surrounding, water quality, and wastewater discharge regulations. Thus, there is an immediate requirement

to enhance scientific information and follow convenient technical and action dealings to monitor ECs in the environmental matrixes, estimate their potential health and environmental risks, and prevent and control their release to water sources and the surrounding. Hence, creditable monitoring, appropriate risk assessment, and confidential removal that consider ECs as a heterogeneous group rather than single substances will be the challenges for the work community in the future.

Conflict of Interest: Authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Authorship Contribution: AF: 20%, ÖK: 20%, GA: 15%, BYD: 10%, SÖK: 10%, MS: 10%, FE: 15%.

Financial Support: This study was supported by the Gazi University Scientific Research Unit (Grant number: 04/2018-08).

Presentation Information: The manuscript was presented in the 9. National Limnology Congress (2021) orally.

Ethics Committee Information: This study is not subject to the permission of HADYЕК in accordance with the “Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees” 8 (k). The data, information and documents presented in this article were obtained within the framework of academic and ethical rules.

Acknowledgement: We would like to thank Ülkü Nihan Tavşanoğlu, Gökben Başaran, Belda Erkmen, Tamer Çırak, Gizem Bezirci and Tuba Bucak for their contribution to field and laboratory studies, Elif Paçal, Fatma Feisal Almas, Tülay Pekmez and Recep Uyar for lab assistance, and Ali Serhan Çağan for field assistance.

REFERENCES

Aydın H, Ustaoglu F, Tepe Y, Soylu EN. Assessment of water quality of streams in northeast Turkey by water quality index and multiple statistical methods. *Environ Forensic* 2021; 22(1-2):270-287.

Battaglin WA, Bradley PM, Iwanowicz L, Journey CA, Walsh HL, Blazer VS. Pharmaceuticals, hormones, pesticides, and other bioactive contaminants in water, sediment, and tissue from Rocky Mountain National Park, 2012-2013. *Sci Total Environ*. 2018; 643: 651-673.

Chaturvedi P, Shukla P, Shekher Giri B, Chowdharya P, Chandrad R, Gupta P, Pandey A. Review article Prevalence and hazardous impact of pharmaceutical and personal care products and antibiotics in environment: A review on emerging contaminants. *Environmental Research* 2021; 194: 110664.

Davidson N, Lauvås AJ, Myhre O, Ropstad E, Carpi D, Mendoza-de Gyves E, Bernsten HF, Dirven H, Paulsen RE, Bal-Price A, Pistollato F. Exposure to human relevant mixtures of halogenated persistent organic pollutants (POPs) alters neurodevelopmental processes in human neural stem cells undergoing differentiation. *Reproductive Toxicology* 2021; 100: 17-34.

Di M, Wang J. Microplastics in surface waters and sediments of the Three Gorges Reservoir, China. *Sci. Total. Environ*. 2018; 616–617: 1620-1627.

Dorak S, Çelik H. Irrigation Water Quality of Nilüfer Stream and Effects of the Wastewater Discharges of the Treatment Plants Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg. 2017; 54 (3): 249-257.

European Commission. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. SANTE/12682/2019 (implemented from 01.01.2020).

Fairbairn DJ, Karpuzcu ME, Arnold WA, Barber BL, Kaufenberg EF, Koskinen WC, Novak PJ, Rice PJ, Swackhamer DL. Sources and transport of contaminants of emerging concern: a two-year study of occurrence and spatiotemporal variation in a mixed land use watershed. *Sci. Total Environ*. 2016; 551-552: 605-613.

Fathi E, Zamani-Ahmadmohmoodi R, Zare-Bidaki R. Water quality evaluation using water quality index and multivariate methods, Beheshtabad River, Iran, *Applied Water Science* 2018; 8: 210.

Gardette M, Perthue A, Gardette J, Janecska T, Földes E, Pukánszky B, Therias S. Photo- and thermal-oxidation of polyethylene: Comparison of mechanisms and influence of unsaturation content, *Polymer Degradation and Stability* 2013; 98(11): 2383-2390.

González S, López-Roldán R, Cortina JL. Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: a review. *Environ. Poll.* 2012; 161: 83-92.

Gray JS. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Marine Pollution Bulletin*, 2002; 45 (1-12): 46-52.

Henry T, Black M. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in Western Mosquitofish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2008; 54: 325-330.

Hidalgo-Ruz V, Gutow L, Thompson RC, Thiel M. Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification. *Environ. Sci. Technol.* 2012; 46: 3060-3075.

Hlavsa MC, Roberts VA, Kahler AM, Hilborn ED, Mecher TR, Beach MJ, Wade TJ, Yoder JS. Outbreaks of Illness Associated with Recreational Water—United States, 2011–2012. *Morb. Mortal. Wkly.* 2015; 64: 668-672.

Meng HB, Wang TR, Guo BY, Hashi Y, Guo CX, Lin JM. Simultaneous determination of inorganic anions and cations in explosive residues by ion chromatography. *Talanta*. 2008; 76(2): 241-245.

Jin L, Whitehead P, Hadjikakou M. A Study of the Yesilirmak River catchment in Northern Turkey: Spatial patterns and temporal trends in water quality, *Journal of Environmental Protection*, 2013; 4: 104-120.

Kasonga TK, Coetzee MAA, Kamika I, Ngole-Jeme VM, Momba MNB. Endocrine-disruptive chemicals as contaminants of emerging concern in wastewater and surface water: A review. *Journal of Environmental Management*, 2021; 277: 111485.

- Klaunig JE, Melo L, Tilmant K.** Mechanisms of hepatic cancer by persistent organic pollutants. *Current Opinion in Toxicology*, 2020; 19: 105-111.
- Kuzukiran O, Yurdakok-Dikmen B, Totan FE, Celik C, Orhan EC, Bilir EK, Kara E, Filazi A.** Analytical method development and validation for some persistent organic pollutants in water and sediments by gas chromatography mass spectrometry. *International Journal of Environmental Research*, 2016; 10(3): 401-410.
- Mason SA, Kammin L, Eriksen M, Aleid G, Wilson S, Box C, Williamson N, Riley A.** Pelagic plastic pollution within the surface waters of Lake Michigan, USA, *Journal of Great Lakes Research*, 2016; 42(4): 753-759.
- Masura J, Baker J, Foster G, Arthur C.** Laboratory Methods for the Analysis of Microplastics in the Marine Environment: Recommendations for Quantifying Synthetic Particles in Waters and Sediments”, NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R, 2015; 48.
- Metelkova L, Zhakovskaya Z, Kukhareva G, Rybalko A, Nikiforov V.** Occurrence of PCDD/PCDFs, dioxin-like PCBs, and PBDEs in surface sediments from the Neva River and the Eastern Gulf of Finland (Russia). *Environmental Science and Pollution Research*, 2019; 26(8): 7375-7389.
- Meybeck M.** Global analysis of river systems: from Earth system controls to Anthropocene syndromes. *The Royal Society*, 2003; 358: 1935-1955.
- Milun V, Lušić J, Despalatović M.** Polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and trace metals in cultured and harvested bivalves from the eastern Adriatic coast (Croatia). *Chemosphere*, 2016; 153: 18-27.
- Muñoz I, López-Doval JC, Ricart M, Villagrasa M, Brix R, Geiszinger A, Ginebreda A, Guasch H, de Alda MJL, Romani AM, Sabater S, Barceló D.** Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the llobregat river basin (Northeast Spain). *Environ. Toxicol. Chem.* 2009; 28: 2706-2714.
- Naushad M.** Surfactant assisted nano-composite cation exchanger: Development, characterization and applications for the removal of toxic Pb²⁺ from aqueous medium. *Chemical Engineering Journal*, 2014; 235: 100-108.
- Noori R, Berndtsson R, Hosseinzadeh M, Adamowski JF, Abyaneh MR.** A critical review on the application of the National Sanitation Foundation Water Quality Index. *Environmental Pollution*, 2019; 244: 575-587.
- Paumo HK, Das R, Bhaumik M, Maity A.** Visible-Light-Responsive Nanostructured Materials for Photocatalytic Degradation of Persistent Organic Pollutants in Water. In *Green Methods for Wastewater Treatment*. Springer, Cham. 2020; 1-29.
- Rice EW, Baird RB, Eaton AB.** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012.
- Roy A, Das BK, Bhattacharya J.** Development and Validation of a Spectrophotometric Method to Measure Sulfate Concentrations in Mine Water without Interference Mine Water *Environ.* 2011; 30:169-174.
- Sharma VK, Anquandah GAK, Yngard RA, Kim H, Fekete J, Bouzek K, Ray AK, Golovko D.** Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: A review on occurrence, fate, and treatment. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 2009; 44: 423-442.
- Tang Y, Zhong Y, Li H, Huang Y, Guo X, Yang F, Wu Y.** Contaminants of emerging concern in aquatic environment: Occurrence, monitoring, fate, and risk assessment. *Water Environment Research* 2020; 92: 1811-1817.
- Yuan T, Vadde KK, Tonkin JD, Wang J, Lu J, Zhang Z, Zhang Y, McCarthy AJ, Sekar R.** Urbanization Impacts the Physicochemical Characteristics and Abundance of Fecal Markers and Bacterial Pathogens in Surface Water *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2019; 16: 1739.
- Qu B, Zhang Y, Kang S, Sillanpää M.** Water quality in the Tibetan Plateau: Major ions and trace elements in rivers of the “Water Tower of Asia” *Science of the Total Environment* 2019; 649: 571-581.
- Üstün GE.** The assessment of heavy metal contamination in the waters of the Nilüfer stream in Bursa. *Ekoloji* 2011; 81: 61-66.
- Vaz S Jr.** What Are Emerging Pollutants (EPs) and Their Fate on the Environment, Chapter 1, in *Analytical Chemistry Applied to Emerging Pollutants*, Springer International Publishing AG, 2018; 1-13.
- Verbruggen EMJ, Brand E.** Risk-based standards for PCBs in soil: Proposals for environmental risk limits and maximum values. 2015; <https://rivm.openrepositary.com/handle/10029/557166>.
- Verhaert V, Newmark N, D'Hollander W, Covaci A, Vlok W, Wepener V, Addo-Bediako A, Jooste A, Teuchies J, Blust R, Bervoets L.** Persistent organic pollutants in the Olifants River Basin, South Africa: bioaccumulation and trophic transfer through a subtropical aquatic food web. *Sci Total Environ.* 2017; 586: 792-806.
- Vieira Y, Lima EC, Foletto EL, Dotto GL.** Microplastics physicochemical properties, specific adsorption modeling and their interaction with pharmaceuticals and other emerging contaminants. *Science of The Total Environment* 2021; 753: 141981.
- Wagner M, Lambert S.** Freshwater Microplastics, Emerging Environmental Contaminants, *The Handbook of Environmental Chemistry Series*, 58, Springer 2018.
- Wilkinson J, Hooda PS, Barker J, Barton S, Swinden J.** Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: an overarching review of the field. *Environ. Pollut.* 2017; 231: 954-970.
- Willett KL, Ulrich EM, Hites RA.** Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers.

Environmental Science & Technology 1998; 32(15): 2197-2207.

Wohlsen TD. Comparative evaluation of chromogenic agar CM1046 and mFC agar for detection of *E. coli* and thermotolerant coliform bacteria from water samples. *Lett Appl Micro- biol* 2011; 53:155-160.

Wu Z, He C, Han W, Song J, Li H, Zhang Y, Wu W. Exposure pathways, levels and toxicity of polybrominated diphenyl ethers in humans: A review. *Environmental Research* 2020; 109531.

Yotova G, Varbanov M, Tcherkezova E, Tsakovski S. Water quality assessment of a river catchment by the composite water quality index and self-organizing maps *Ecological Indicators* 2021; 120: 106872.

Yurdakok B, Tekin K, Daskin A, Filazi A. Effects of polychlorinated biphenyls 28, 30 and 118 on bovine spermatozoa in vitro. *Reproduction in Domestic Animals* 2015; 50(1): 41-47.

Zeng H, Fu X, Liang Y, Qin L, Mo L. Risk assessment of an organochlorine pesticide mixture in the surface waters of Qingshitan Reservoir in Southwest China. *RSC Advances*, 2018; 8(32): 17797-17805.

Short-Term Rectal Enema Probiotic Treatment with Intestinal Microbiota Analysis in Cats with Chronic Enteropathy

Kerem URAL¹, Hasan ERDOĞAN¹, Songül ERDOĞAN¹, Serdar PAŞA¹, Tuğba ASLAN¹, Cansu BALIKÇI^{1*}, Gamze GÖKÇAY¹

¹ Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, Türkiye

ABSTRACT

An imbalance in gut microbiota detected to serve as a predisposing factor for existence of chronic inflammation of the gastrointestinal tract, such as chronic enteropathy among cats. Given the postulation that probiotic administration might mitigate gastrointestinal disorders, its effects via rectal route have never been explored in our country among cats with chronic enteropathy. Thus the purpose of the present study was to evaluate the therapeutical efficacy of an multiple chain probiotic treatment involving *Bifidobacterium* combination [*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*], *Lactobacillus* strains [*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gastricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*], *Bacillus* strains [*Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*] and a next generation probiotic *Akkermansia muciniphilia* via rectal route (enema) in cats with cEnT. Diagnosis was based on a) clinical, b) hematological and serum biochemical analysis along with scoring to those of Feline Chronic Enteropathy Activity Index (FCEAI). Each cat was inspected and analyzed/reevaluated and assigned a FCEAI score at the start and end of treatment for 10 day induction period. Rectal enema probiotic treatment resulted with significantly decreased composite FCEAI score ($p<0.01$) and laboratory parameters re-evaluation values ($p<0.01$) subjected to interpretation. This treatment modality without any side effects, should be substitute other relevant treatment modalities with relapsing and degenerative effects.

Keywords: Dysbiosis, GI inflammation, Microbiome analysis, Probioteraphy

Kronik Enteropatili Kedilerde Bağırsak Mikrobiyota Analizleri İle Kısa Dönem Rektal Enema Probiyotik Sağaltımı

ÖZ

Bağırsak mikrobiyotasındaki dengesizliklerin kedilerdeki kronik enteropatilerde olduğu gibi gastrointestinal sistemdeki kronik inflamasyon oluşumu için de hazırlayıcı bir faktör olarak hizmet ettiği tespit edilmiştir. Probiyotik uygulamasının gastrointestinal rahatsızlıkları azaltabileceği varsayımı göz önüne alındığında, ülkemizde kronik enteropatili kedilerde rektal yoldan probiyotik uygulaması sonucu oluşabilecek olası etkileri henüz araştırılmamıştır. Bu bilgiler nedeniyle sunulan bu çalışmanın amacı, kedilerde *Bifidobacterium* kombinasyonu [*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*], *Lactobacillus* suşları [*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gastricus*, *Lactobacillus acidophilus*], *Bacillus* suşları [*Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*] ve yeni nesil bir probiyotik olan *Akkermansia muciniphilia*'yi içeren çok zincirli bir probiyotik tedavisinin terapötik etkinliğini, kedilerde rektal yoldan (enema) değerlendirmektir. Teşhiste a) klinik, b) hematolojik ve serum biyokimyasal analizlerin yanında Feline Kronik Enteropati Aktivite İndeksi'ne (FCEAI) göre puanlamalar yapılarak gerçekleştirildi. Araştırma kapsamında değerlendirilen her kedi sağaltım öncesi ve sağaltım sonrasını kapsayan 10 günlük sürede analiz edilerek yeniden değerlendirildi. Rektal enema yolu ile uygulanan probiyotik tedavisi sonucu, "yorumlamaya tabi tutulmuş kompozit FCEAI skoru" ($p<0.01$) ve laboratuvar parametreleri yeniden değerlendirmede ($p<0.01$) anlamlı derecede azalmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında herhangi bir yan etkisi olmayan bu tedavi yönteminin, tekrarlayan ve dejeneratif etkileri olan diğer ilgili tedavi yöntemlerinin yerini alabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Disbiyoz, Gİ inflamasyon, Mikrobiyom analizi, Probiyoterapi

To cite this article: Ural K, Erdoğan H, Erdoğan S, Paşa S, Aslan T, Balıkcı C, Gökçay G. Short-Term Rectal Enema Probiotic Treatment with Intestinal Microbiota Analysis in Cats with Chronic Enteropathy. . Kocatepe Vet J. (2023):16(1): 16-30

Submission: 19.09.2022 Accepted: 03.01.2023 Published Online: 24.02.2023

ORCID ID; KU: 0000-0003-1867-7143, HE: 0000-0001-5141-5108, SE: 0000-0002-7833-5519, SP: 0000-0003-4957-9263, TA: 0000-0001-7337-9769, CB: 0000-0002-6261-162X, GG: 0000-0002-7421-1543

*Corresponding author e-mail: balikcicansu98@gmail.com

Kedilerde, kronik enteropatinin (kEnt) çeşitli sebepleri olsa da hastalık genel itibarı ile, idiopatik inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBH) ve gıda eliminasyonuna cevap veren enteropati (GcE) olarak iki sendromu içerebilmektedir (Jergens ve ark., 1992; Dennis ve ark., 1992; Dennis ve ark., 1993; Hart ve ark., 1994). Her iki hastalıkta da persiste ya da nüks edici karakterde (ki bu çalışmanın yazarlarına göre de kliniklere getirilen kedilerde en sıklıkla verilen anamnezdir) farklı patojenik mekanizmalarla şekillenen gastrointestinal belirtiler mevcut olup, her iki formda da spesifik sağaltıma alınan cevaba ilişkin retrospektif tanıya gidilmektedir (Hall ve German, 2004). Kedilerde meydana gelen klinik bulgular çok değişken olup hastalığın şiddeti kediden kediyeye farklılaşmakta, bunu belirleyen unsurlar arasında enteropatinin i) tipi, ii) lokalizasyonu ile iii) gastrointestinal (gi) kanalda etkilenen bölgedeki yaygınlığı rol almaktadır (Jergens ve ark., 1992; Dennis ve ark., 1992; Dennis ve ark., 1993).

Üniversite klinik pratiğimizde giderek artan sayıda kronik enteropati ve buna ilişkin klinik bulgularla getirilen kedilerle karşılaşmaktayız. Bu kedilerin çok önemli bir kısmında farklı beslenme rejimleri deneme/yanılma ile hasta sahipleri nezdinde uygulanmakta, olgular kliniğe getirildikten sonra da hastalığa özgü diyet seçimleri yapılmakta, gıda eliminasyon diyeti de denenmektedir. Olgularda başarılı sağaltım uygulamalarının kısa vadede gerçekleşmemesi ve çoğunluğunda nüks görülmesi sebebi ile “besinsel unsurlar-alerji-gastrointestinal lezyonların” ilişkisinin araştırılması ve probiyotiklerin (yararlı minicanlıların) sağaltımdaki önemini değerlendirilmesi gerektiği, bu çalışmayı dizayn eden araştırmacılar tarafından düşünülmüştür.

Geniş kitlelerde ve sağlık sektöründe ‘dost bakteriler’ olarak bilinen probiyotikler, henüz pet hayvanlarının sağlığı ve refahına yönelik hak ettiği değeri bulamamıştır. Kanıta dayalı veri havuzunda ise halen önemli (özellikle ulusal düzeyde daha da önemlidir) eksiklikler mevcuttur. Tüm bu unsurlar literatür araştırması yapan veteriner hekimlerin klasik kaynaklara yönelmesine ve immunsupresif sağaltım ölçekli uygulamalarda bulunmasına neden olmaktadır. Benzer olarak, klinik uygulamamızda intestinal permeabiliteye ve/veya geçirgenlik artışına yönelik sağaltımın başarı getireceğine dair ciddi veriler probiyotik uygulamalarının önemine işaret etmektedir (Marsilio, 2021). Bu çalışmada klasik sağaltım uygulamalarına karşın öncü bir araştırma bakış açısı ile kısa dönem çoklu suş probiyotik rektal enemasının kronik enteropatili kedilerde sağaltım etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Olguların Tanımlanması

Felin Kronik Enteropati Aktivite İndeksinde (FkEaİ) kullanılan gastrointestinal bulgular (Şekil 1) 0 ila 3 arasında değişkenler olarak skorlanmaktadır (Tablo 1) (Jergens ve ark., 2010). Hastaların seçiminde anamnez bulguları ve klinik muayene kriterleri göz önüne alınarak çalışmaya alındı. Bu çalışmada söz konusu aktivite indeksi modifiye edilerek [endoskopik verilerin ve fosfor analizlerinin eksikliği (teknik ve idari sorun) sebebiyle] saha şartlarına uygun olarak sadece aşağıda gösterilen parametreler ve ilgili skorlar saptanmıştır. Orijinal halinden (Jergens ve ark., 2010) sapılmayarak, sadece yukarıda bahis konusu olduğu üzere bakılmayan parametreler zaruriyet içerisinde çıkarılarak modifiye eksiltilmiş FkEaİ [meFkEaİ] uygulanmıştır. Araştırmamız kapsamında toplamda 10 Felin Kronik Enteropatili kedi değerlendirilmeye alınmıştır.

Bağırsak Mikrobiyom Analizleri

Örnekleme Prosedürü

Kısıtlı bütçe ve iktisadi koşullar (kur dalgalanması) göz önünde bulundurularak sadece sağaltım öncesi verilere yönelik mikrobiyom analizleri (8/10 olguda) hizmet alımı şeklinde, yurt dışında gerçekleştirildi. Kısaca rektumdan 5 cm civarında ilerisi steril koton svap aracılığıyla (dışkı değil, lümen hedeflenerek) lümen örneklerinin alınmasını sağladı. Hazır olarak evvelden temin edilen test materyalleri kullanıldı. Kutu içeriğinde rektal örnekleme için kullanıma hazır steril svaplar, numune aktarma kapları (hazır buffer solüsyonu içeren) mevcuttu. Örnekler hizmet alımı ile Amerika Birleşik Devletleri’ne Midog Merkezine (Center) ulaştırıldı.

Mikrobiyota Analiz Metodolojisi

Toplamda çalışmaya dahil edilen 10 kediden 8’inde mikrobiyom analizleri gerçekleştirilebildi. MiDOG® (All-in-One Microbial Test) kullanılarak hedefli yeni jenerasyon DNA sekanslama testi uygulandı. Bu test ile spesifik mikroorganizmaların tanımlanması ve karakterizasyonuna yönelik moleküler imzaların belirlenmesi amaçlandı. Son sözü edilen test elde edilen örneklerin muhafazalı korunma ile nakil sonrası Midog Merkezinde DNA ekstraksiyonu (örnekleme açığa çıkabilen mikropların tamamına yönelik) mikrobiyel DNA’nın seçici amplifikasyonu ile yeni jenerasyon DNA sekanslama (Illumina, Inc., San Diego, CA) vasıtasıyla gerçekleştirildi. Akan veri analizi, toplanan örneklerde mevcut bakterilerin kesin ve doğru (tür düzeyinde) tanımlamalarına olanak sağlamak adına, DNA dizilerini harici hizalamak için küratörlü mikrobiyel veritabanı aracılığıyla gerçekleştirildi.

Sağaltım Modellemesi

Sağaltım modellemesinde Prof. Dr. Kerem Ural'ın bilimsel literatüre kattığı şekli ile “değişmeli takvim probiyoterapi” (Ural ve ark., 2020a, 2020b) çoklu suş hali uygulandı. Çalışmamızda kullanılan (günlük) rektal enema probiyotik sağaltımında metodolojik yaklaşımda probiyotik enema olarak kullanılan *Cocobiotic* (*Akkermansia muciniphilia*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gastricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*) (Art de Huille, Hülya Kayhan) farmasötik takdim şekli usulüne uygun şekilde hazırlanarak, rektumdan 15 cm ileriye tatbik edildi (Şekil 2). Çalışmamızda sağaltım modellememizin tüm olgularda herhangi bir yan etkiye neden olmaksızın ilgili protokol titizlikle, aksatılmadan uygulanması sağlandı.

BULGULAR

Klinik olgu resimleri şekiller 3-14 arası sunuldu. Olgulara ait bireysel (tablo 2 ve şekil 2) FkEaİ skorlamaları ile skora ait ortanca değerler şekil 3 ve 4'te gösterildi. Klinik bulgularda (şekil 3) ve serum biyokimyasal bulgularında meydana gelen değişimler (şekil 4) ayrı ayrı bar grafik olarak sunuldu. Terapötik sağaltım modellememiz eşliğinde gerek klinik bulgularda gerekse laboratuvar analizlerinde ortanca değerlere ait değişim (azalma) klinik iyileşmeyi de

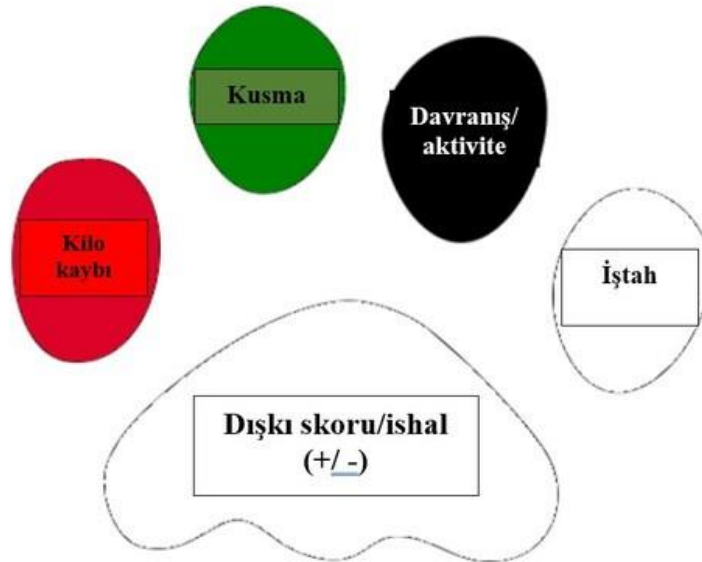
beraberinde getirdi. On günlük rektal enema protokolünde herhangi bir yan etki saptanmadı.

Olgulara Ait Klinik ve Makroskobik Değerlendirme

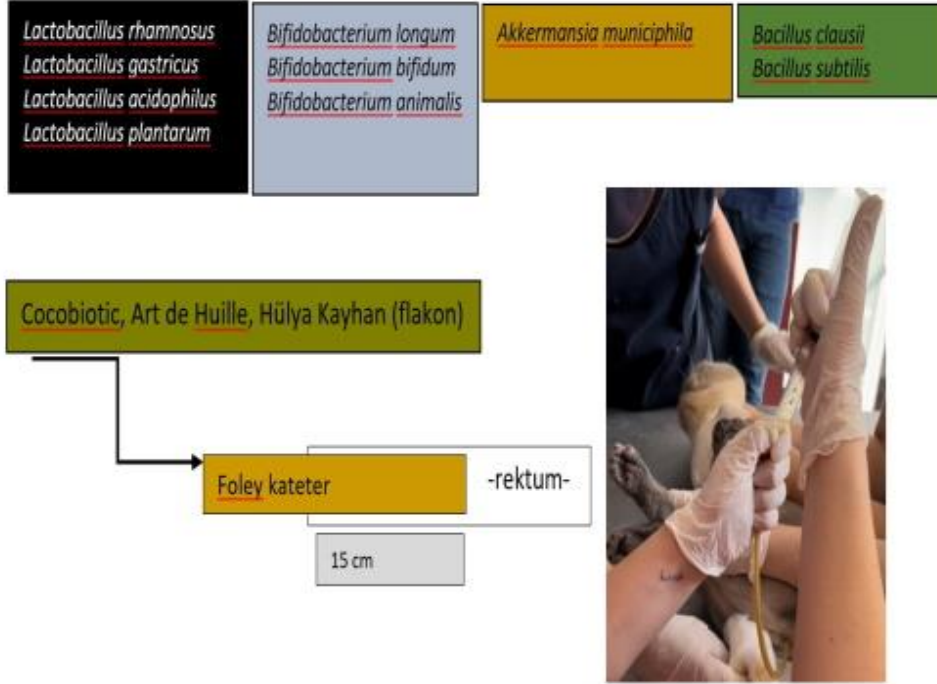
Olgulardan bazılarında ait demografik verileri de kısaca içeren açıklamalar görseller eşliğinde aşağıda kısıtlı ve kısa olgu atlası şeklinde sunuldu (Şekil 7-14).

Mikrobiyota Analizleri


Mikrobiyotanın sınıf seviyesinde dağılımı Şekil 15 ile 16 ve Tablo 2' de gösterildi. Mikrobiyel toplulukların filum, sınıf, sıra, aile, genus ve tür düzeylerinde genel dağılımına ait veri havuzu Temel (asıl) koordinat analizleri, α dağılım sonuçları ile de desteklendi. İlâveten oldukça az sayıda literatürle karşılaştırmalı olarak bağırsak mikrobiyel aile (toplulukları) düzeyinde bu çalışma kapsamında özellikle verildi. Tek değişkenli ve operasyonel taksonomik ünite (OTU) analizleri doğrultusunda kEnt bulunan kedilerde fakültatif anaerobik taksa alt değerlendirmesinde *Firmicutes* filumunda [*Ruminococcaceae* (bağıl bolluk 10 olgudan 8'inde minimum-maksimum %0-2,7) ve *Turicibacteraceae* (-) aileleri] daha düşük zenginlikle saptanırken; yine fakültatif anaerobik taksa altında *Enterobacteriaceae* (minimum-maksimum %0,2-8,2) ile *Streptococcaceae* (minimum-maksimum %0-28,8) ailelerinde artış tespit edilmiştir (Şekil 15 ve 16).



Şekil 1. Çalışmaya dahil edilen klinik parametreleri



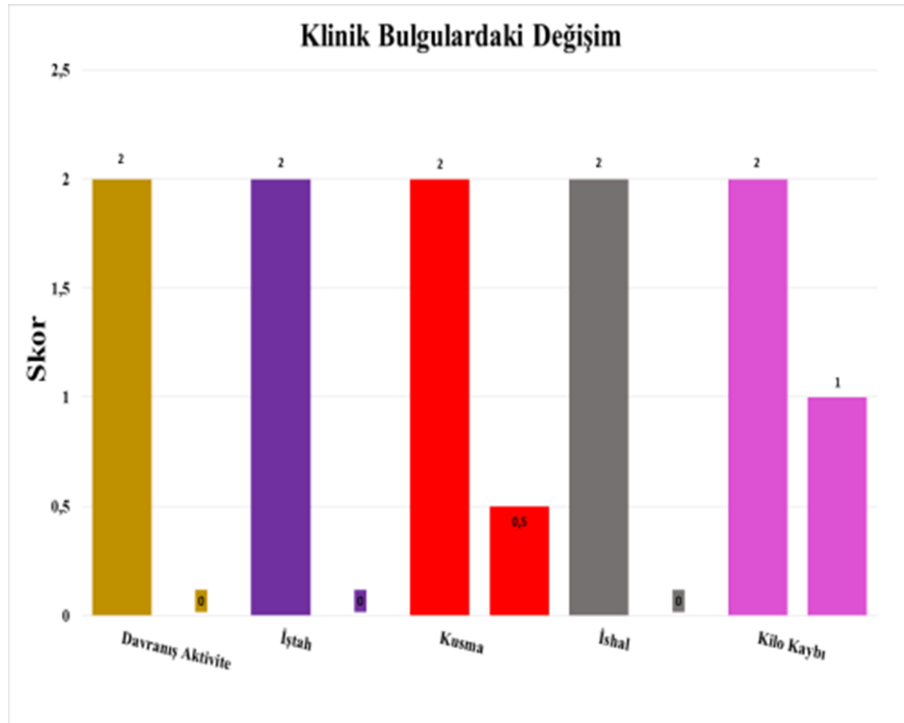
Şekil 2. Çalışmada rektal enema ile uygulanan probiyotik (çoklu suş içeren) kombinasyonunun şematik ve aktif uygulama prosedürleri (Olgu I).

	Faktör skor/puantaj			Ara toplam
<u>Gi belirtiler</u>	1 <u>hafif</u>	2 <u>orta</u>	3 <u>şiddetli</u>	
Tutum/aktivite		<u>x</u>		= 2
İştah			<u>x</u>	= 3
Kusma		<u>x</u>		= 2
<u>ishal</u>			<u>x</u>	= 3
Kilo <u>kayıbı</u>			<u>x</u>	= 3
Toplam puan				13

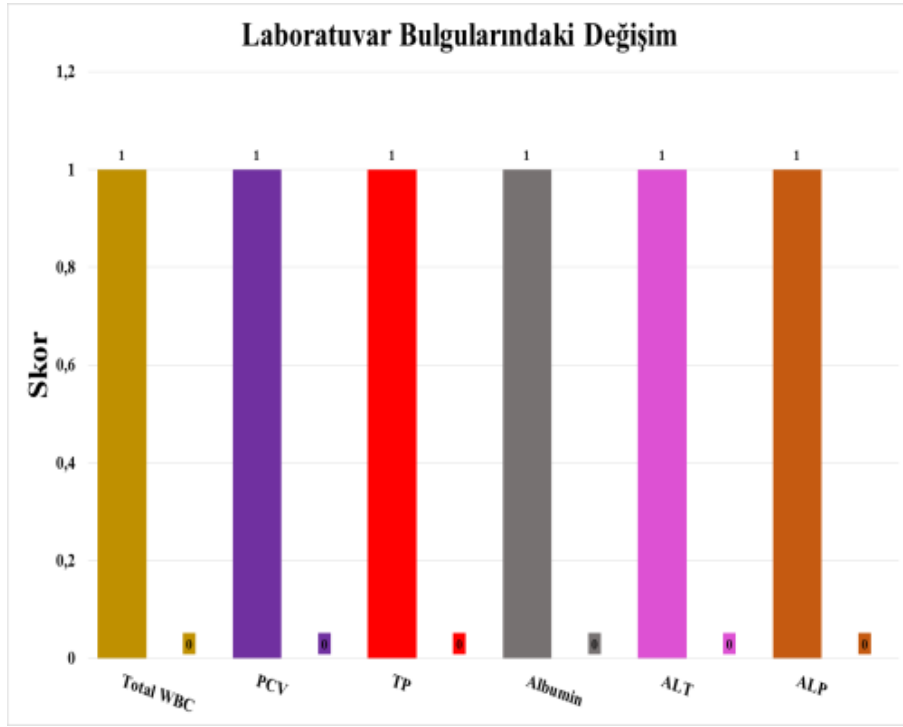
Şekil 3. II nolu olguda modifiye eksiltilmiş FkEaİ skoru örnekleme. Olgularda klinik skorlama önceki literatür eşliğinde (Jergens ve ark., 2010) modifiye edilerek hesaplandı.

Gİ BELİRTİ	Faktör			Ara toplam	
Tutum/aktivite	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-	1
	hafif	orta	şiddetli		
İştah	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	=	0
	hafif	orta	şiddetli		
Kusma	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-	2
	hafif	orta	şiddetli		
İshal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-	0
	hafif	orta	şiddetli		
Kilo kaybı	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-	2
	hafif	orta	şiddetli		
Endoskopik lezyonlar	<input type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	-	1
	hayır		evet		
Toplam protein	<input type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	-	1
	normal		artış		
ALT/ALP	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	-	0
	normal		artış		
Fosfor	<input type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	-	1
	normal		azalış		
bileşik FCEAI skoru elde etmek için ara toplam ekleyin				→	8

Şekil 4. Orijinal hali ile (Jergens ve ark., 2010) FkEaİ kompozit skorunun olgu bazlı hesaplanması. Görsel orijinal halinden öz dilimize farklılaştırılarak bu çalışma kapsamındaki bir olguya yorumlanmış ve hesaplanmıştır. Eksiltelen parametre (fosfor) hesaplamaya dahil edilemediğinden (idari ve mali iktisadi koşullar) meFkEaİ değerlendirmesi zaruri kılınmıştır.



Şekil 5. Kronik enteropatili ve çalışmaya dahil edilen kEnt'li kedilerde rektal enema ile probiyotik yolla uygulanması öncesi 0. gün ile 10. gündeki değişim ile meFkEaİ skorları.



Şekil 6. Kronik enteropatili ve çalışmaya dahil edilen edilen kEnt'li kedilerde rektal enema ile probiyotik uygulanması öncesi 0. gün ile 10. gündeki laboratuvar bulgularında değişim ile meFkEaİ skorları.



Şekil 7. Olgu III. İki buçuk yıldır süregelen ve çözülmemiş kEnt'i mevcut kedide a) herhangi bir uygulamada bulunulmadan hemen önce, b) sağaltım protokolümüze eşlik eder şekilde 3. ve 11. günlerdeki dışkınn kompozisyonu. Olgunun meFkEaİ kompozit skorunda bariz ve belirgin derecede azalma mevcut.



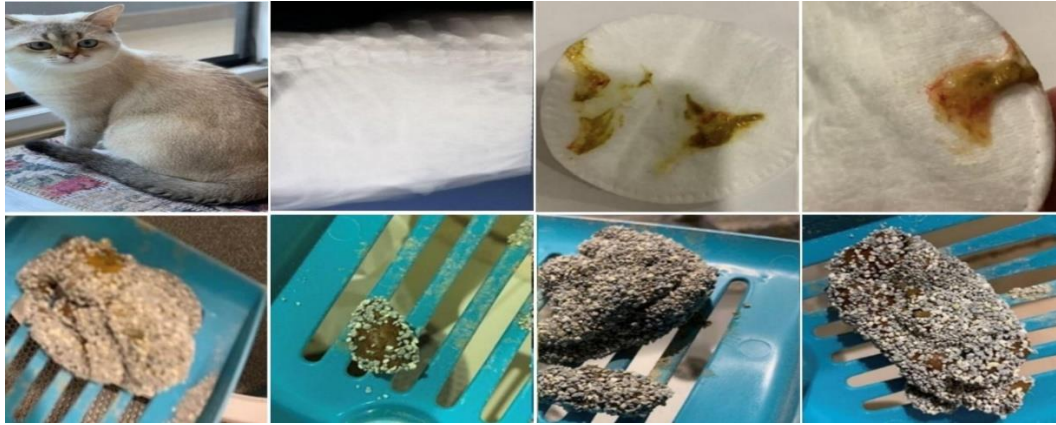
Şekil 8. Olgu IV. Yaklaşık 1 yıldır süregelen kronikleşmiş gi problemleri, dolayısıyla çözülmemeyen kEnt'i bulunan kedide (sahibi de ilgili bir Veteriner Hekim) daha sağaltımın hemen başlarında değişimin mimarı elbette çalışma protokolümü. Çalışma başlangıcındaki meFkEaİ skorunda meydana gelen değişime çalışma sonundaki klinik iyileşme, uzun dönem nüks görülmemesi de yerleşik mikrobiyomun düzenlediğinin, muhtemel disbiyozisin giderildiğinin ve bağırsaktaki enflamasyonun çözümlendiğinin emareleri



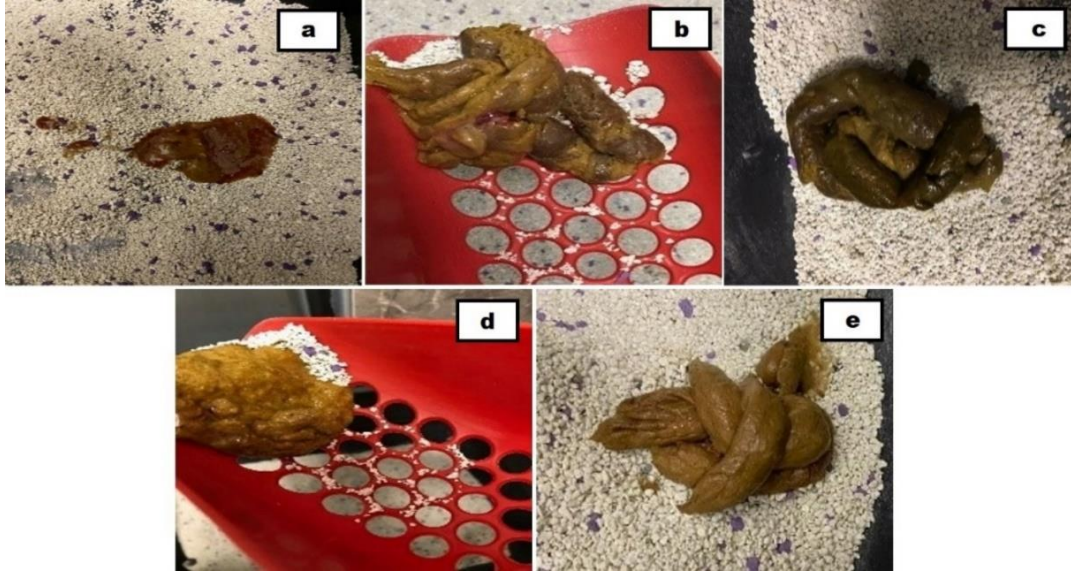
Şekil 9. a) Olgu V. Glutenli ve soyalı mama devam ederken çalışma takvimine geçilmeden hemen önce-3. gün, b)-2. gün, c) çalışma takvimi ile doğru orantılı probiyotik uygulamasından sonraki 7. saat, d) 31. saat, e)55. saat, f) 79. saat.



Şekil 10. Olgu VI. Mukoid kıvamdaki dışkıda değişim ve dönüşüm çalışma protokolünün başarılı olduğunun kanıta dayalı verisi. Dışkı kompozit skorunda ve meFkEaİ kompozit skorunda bariz ve belirgin derecede azalma mevcut.



Şekil 11. Olgu VII. Çok uzun yıllardır kEnt'i bulunan kedide mukoid kıvamdaki dışkılama, çalışma protokolümüzün devreye girmesi ile meFkEaİ kompozit skorunda değişimle kanıta dayalı hale dönüşüyor.



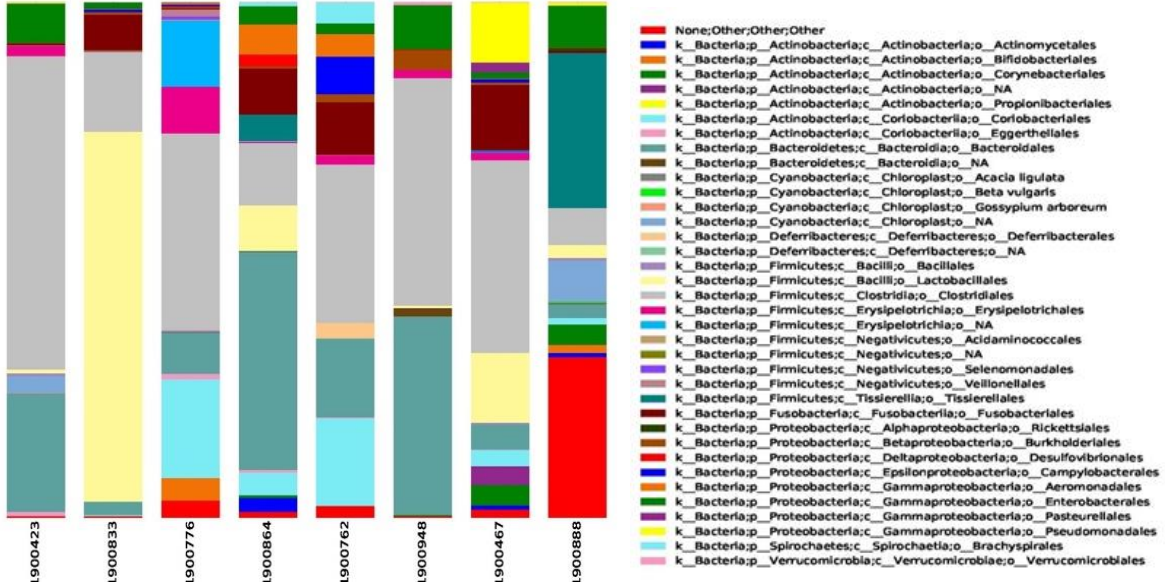
Şekil 12. Olgu VIII. Sırası ile a) sağaltım öncesi, b)18.06.2021, c)24.06.2021, d) 06.07.2021, e)10.07.2021 tarihlerinde değişim ve dönüşümü ispatlar nitelikte.



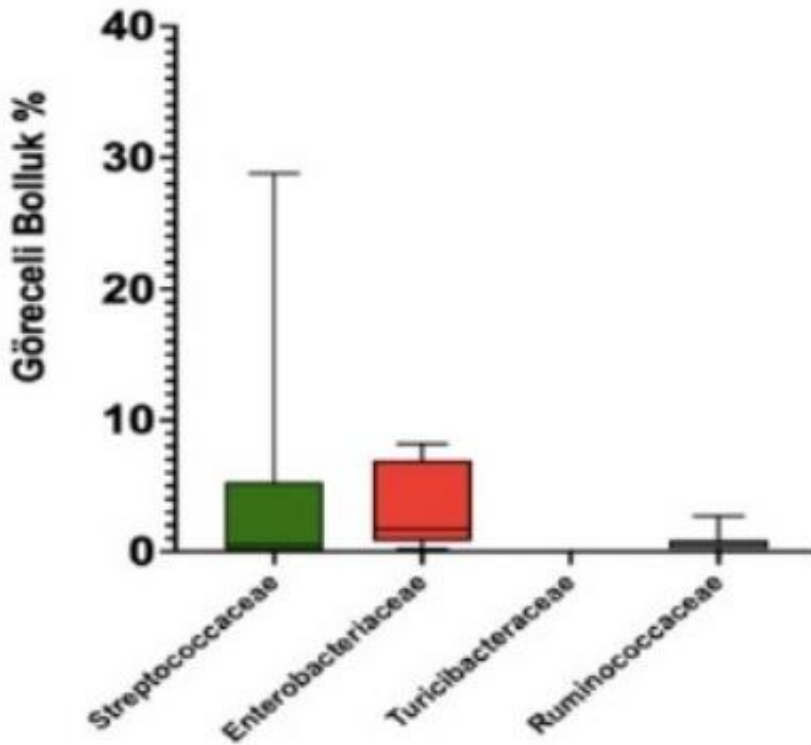
Şekil 13. Ardışık 10 dışkıda makroskopik görünüm. Hasta sahibinden alınan bilgi ve kayıt altına alınan sayısız görsel arasından yaptığımız seçimlerde ardışık 6 dışkının yalnızca 1'inde kan görülmesi oldukça sevindirici. Olgunun kronikleşen kE tablosunun olumlu yönde seyri hasta sahibi memnuniyetini de beraberinde getiriyor.



Şekil 14. Aktif takibi oldukça düzenli şekilde hem tarafımızca hem de hasta sahibince yapılan olgumuzda değişim ile dönüşüm oldukça tatmin edici.



Şekil 15. Çalışmamıza dahil edilen kEnt’li kedilerden 8’inde bağırsak mikrobiyotasının sınıf seviyesinde bağıllı bollağına ait topluluk (community) barplot analizleri. Renkli kutucuklar farklı bakteriyel biyoçeşitliliğe ait verileri sunmaktadır. Mikrobiyom akan veri analizi sadece sağıltım öncesine aittir.



Şekil 16. Bağıllı (göreceli) bollağı oranları aile düzeyinde gösterimi

Tablo 1. Klinik parametrelerin skorlandırılması (Jergens ve ark., 2010).

Değişken	Birim / Kod
Tutum / aktivite	<ul style="list-style-type: none">0 normal1 hafif azalma2 ılımlı artış3 ciddi azalma
İştah	<ul style="list-style-type: none">0 normal1 hafif azalma2 ılımlı azalma3 ciddi azalma
Kusma	<ul style="list-style-type: none">0 hiçbiri1 hafif (1 kez / hafta)2 orta (2-3 kez / hafta)3 şiddetli (4 kez > / hafta)
İshal	<ul style="list-style-type: none">0 iyi şekillendirilmiş dışkı1 hafif yumuşak dışkı, dışkı kanı, mukus veya hafif artmış frekans (2-3 kez / gün)2 çok yumuşak dışkı veya nispeten artmış frekans (4-5 kez / gün)3 sulu ishal veya ciddi oranda artmış frekans (> 5 kez / gün)
Kilo kaybı	<ul style="list-style-type: none">0 yok1 hafif (% < 5 kayıp)2 orta (% 5-10 kayıp)3 ciddi (% >10 kayıp)

Tablo 2. OTU analizleri dahilinde taksonomik verilerle destekli aile düzeyinde (öne çıkan ve seçilmiş) bağıl bolluk (ortanca, min. ve maks. değerleri)

Seviye	Taksonomi	Ortalama	Ortanca	Min-mak
Aile	Streptococcaceae	%5.01	%0.05	%0- %28.8
Aile	Enterobacteriaceae	%3.3	%1.7	%0.2- %8.2
Aile	Turicibacteraceae	%0	%0	%0
Aile	Ruminococcaceae	%0.08	%0.7	%0- %2.7

TARTIŞMA

Gastrointestinal kanalda komensal mikrobiyota düzenli olarak intestinal epiteliyal hücrelerle etkileşimde olup, bu durum sağlıklı bir gi kanalın inşasında (Ley ve ark., 2006) ve immun sistemin fonksiyonlarında elzemdir (Artis, 2008). Gi kanalı çevreleyen epiteliyal hücreler; enterik mikrobiyotayı ve konakçı dokuları birbirlerinden ayıran bir bariyer olarak anahtar rolde gi homeostazisi sağlayarak patojenik bakterilere karşı ilk adım defans mekanizmalarında rol almaktadır. Şayet

disfonksiyonel intestinal bariyer mevcut ise intestinal lümen

mezenterik lenf nodüllerine ve sistemik sirkülasyona bakteriyel translokasyon şekillenebilmektedir. Müteakip karaciğer, dalak vb. organlarda infiltrasyon ile muhtemel sepsis ve çoklu organ yetmezlikleri şekillenebilir (Turner, 2006). Yine de inflamatuvar bağırsak hastalığında intestinal bariyer fonksiyonunun rolü tam açıklığa kavuşturulmaması da, iyi birer fitokimyasal [fenolik asit, flavonoidler, mineraller ve vitaminler] kaynağı olan meyve ve sebzelerin, kolonik

mikrobiyota tarafından açığa çıkarılan metabolitleri anti-inflamatuvar etkinlik göstermektedir (Larrosa ve ark., 2009). Bu yönüyle değerlendirildiğinde beslenmenin düzenlenmesi ve fitokimyasal nitelikte yem katkı maddeleri ile nutrasötiklerin, ilaveten bu çalışmaya konu olduğu üzere probiyotiklerin kullanımının ne kadar önemli olduğu daha iyi anlaşılabilir. Biz de bu çalışmada enema ile 'değişmeli takvim probiyoterapi' (Ural ve ark., 2020a; Ural, 2020b) uygulamasının yeni evrilmiş hali ile çoklu suş probiyoterapide rektal enema ile kısa vadede kEnt sağaltımındaki etkinliği değerlendirildi.

İnsanlarda inflamatuvar bağırsak hastalığının (IBD) patogenezi irdelendiğinde oluşagelen disbiyozis, metabolitlerin üretimindeki bozulma ile ilişkilendirilmektedir. Asetat, propionat ve bütirat formlarında kısa zincirli yağ asitleri üretiminde *Faecalibacterium prausnitzii* vb. bakteriler yer almaktadır. Asetat formları bütirat için substrat olmakla beraber; bağırsak epitelial hücreleri için ana enerji kaynağı da bütirattır. IBD'den muzdarip insanlara ait dışkı örneklerinde bütirat üreten bakterilerin sayısında azalma tespit edilmiştir (Li ve ark., 2015; Machiels ve ark., 2014; Mahowald ve ark., 2009; Wong ve ark., 2006). Bizim çalışmamızda *Firmicutes*;c__*Clostridia*;o__*Clostridiales*;f__*Ruminococcaceae*;g__*Faecalibacterium* [sırası ile filum, sınıf, sıra, aile ve genus] düzeylerinde 8 olguda [yine sırası ile %0.0, %0.3, %0.4, %0.1, %0.0, %0.0, %0.5 ve %0.0] bağıl bollukta *Faecalibacterium* tespit edilmiş, her ne kadar karşılaştırmalı mikrobiyom analizi yapılamasa da bunun bütirat üreten bakterilerin sayısında azalmaya işaret edebileceği düşünülmüştür.

Yukarıdaki paragraf ile bilimsel manada etkileşim içerisinde rol model hastalıklar denkleminde IBD ile kEnt'i de eşleştirmek yerinde olacaktır. İntestinal mikrobiyomun üniversal aktivitesi karbonhidratların metabolize edilmesi ve fermentasyonu vasıtası ile asetat, propionat ve bütirat formlarında kısa zincirli yağ asitleri üretimine dönüşümüdür. *Firmicutes* filumunda çoğunlukla anaerobik unsurlar yer almaktadır ki, indirekt anti-inflamatuvar ve immun-modülatör etkinliklerini kısmen bütirat olma üzere, kısa zincirli yağ asitlerini üreterek gösterdikleri bilinmektedir (Walker ve Lawley, 2013). Kolonositlerin ana enerji kaynağının bütirat olduğu (Roeddiger, 1980) göz önünde bulundurulursa, epitelial hücre proliferasyonu ile tamir ve intestinal bariyer bütünlüğünün sağlanmasındaki önemi daha net anlaşılabilir (Ashida ve ark., 2012). Tüm bunların yanı sıra bütirat, anti-inflamatuvar ve anti-karsinojenik özellikleri (Canani ve ark., Siavoshian ve ark., 2000) ile öne çıkabilmektedir. İnsanlarda kolonda bütirat üreten bakterilerin ana üyeleri *Firmicutes* filumuna ait *Lachnospiraceae* ve *Ruminococcaceae* ailesi olmakla birlikte, dışkıdaki miktarları değişken olup, ülseratif kolitiste dahil disbiyotik durumlarda sıklıkla azalmaktadır (Halfvarson ve ark., 2017; Nagao-Kitamoto ve Kamada, 2017). Benzer olarak yine kEnt'li kedilerde bütirat üreten bakterilerin sayılarında azalma tespit

edilmiştir (Marsilio ve ark., 2019). İnflamatuvar bağırsak hastalığı bulunan kedilerde fekal mikrobiyom analizleri, tek değişkenli ve de LEfSE analizleri ile incelendiğinde, inflamatuvar bağırsak hastalığı bulunan kedilerde fakültatif anaerobik taksa altında, *Firmicutes* filumunda [*Ruminococcaceae* ve *Turicibacteraceae* aileleri], *Actinobacteria* [*Bifidobacterium* genusu] ve *Bacteroidetes* filumlarında azalma belirlenirken; yine fakültatif anaerobik taksa altında *Enterobacteriaceae* ile *Streptococcaceae* ailelerinde artış tespit edilmiştir (Marsilio ve ark., 2019). Özellikle kEnt'li kedilerde *Ruminococcaceae* ailesine mensup türlerin dışkıdaki kümesel yoğunluğu ile bütirat konsantrasyonları arasındaki ilişkinin belirlenmesi, bu taksona ait bakterilerin fonksiyonlarının daha net değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır (Marsilio ve ark., 2019). Çalışmamızda yaptığımız OTU analizleri doğrultusunda kEnt mevcut kedilerde *Ruminococcaceae* [Analizi gerçekleştirilen 8 olguda bağıl bolluk minimum-maksimum %0-2.7, ortalama %0.08 ve medyan %0.7] ve *Turicibacteraceae* (-) aileleri], daha düşük miktarda saptanırken; *Enterobacteriaceae* (minimum-maksimum % 0.2-8.2, ortalama %3.3, ortanca %1.7) ile *Streptococcaceae* (minimum-maksimum % 0-28.8, ortalama %5.01, ortanca %0.05) ailelerinde artış tespit edilmiştir (Şekil 15 – 16, Tablo 2).

İnülün tipinde fruktanların kolon fermantasyonu esnasında en önemli etkilerinden birisi bifidobakteriyel sayılarda artış, diğer bilinen ismi ile 'bifidojenik etkidir ki (Gibson ve Roberfroid, 1995; Roberfroid ve ark., 1995), aynı zamanda kolon bütirat üretimi de uyarılarak, bu kez de 'bütirojenik etki' (Falony ve De Vuyst, 2009; Morrison ve ark., 2006; Tsukahara ve ark., 2003) sağlanır. Bu 'bifidojenik etki' ile 'bütirojenik etki' konakçı sağlığı açısından son derece önem arz etmekte ve bifidobakterilerin bütirat üretmedikleri bilinmektedir (Falony ve De Vuyst, 2009; Falony ve ark., 2006; Makras ve ark., 2006; Van der Meulen ve ark., 2004). Bağırsak mikrobiyomunun dengelenmesinde katkısı bulunan bifidobakteri türlerinin yanı sıra kolon epitelial hücrelerinin önemli enerji kaynağı konumundaki bütiratın intestinal hücrelerde gelişim ile gen ekspresyonlarında rol alması ile gerek kolitisten gerekse kolorektal kanserden korunma sağlanmaktadır (Falony ve De Vuyst, 2009; Hamer ve ark., 2008; Macfarlane, 1991; Scheppach ve Weiler, 2004). Çalışmamızda kEnt'li kedilerde çoklu suş içeren değişmeli takvim probiyoterapi kapsamında rektal yolla kullanılan bifidobakteri suşlarının da benzer etkiyi göstermiş olması muhtemeldir. Yine çalışmamızda değerlendirdiğimiz, bütirat üretmediği ve genomlarında bütirat üretimine ait yolları bulunmadığı bilinen 4'lü bifidobakteri (Klijn ve ark., 2005; Makras ve ark., 2005) suşlarının besinsel öğelerle karşılanan inülün tipinde fruktanlara ilişkin gelişiminde ve bütirat üretiminde artışa, dolayısıyla da 'bifidojenik etki'ye eşlik edebilecek 'bütirojenik etki'yi kısa sürede gösterebileceği düşünülmüştür (Falony ve De Vuyst, 2009; Morrison ve ark., 2006; Tsukahara ve ark., 2003). Elde ettiğimiz bulgular, çalışma

protokolümüz içerisinde yer alan 3'lü bifidobakteri suşlarının sağaltımda diğer suşlara ilave olumlu yönde katkı sunması yönünden değerlidir. Şöyle ki klinik ve laboratuvar bulgularındaki değişim ve meFkEaI skorundaki (Jergens ve ark., 2010) azalma diğer probiyotik suşlarının yanı sıra bifidobakterlerle de ilişkide olabilir. İlaveten çalışma sonuçlarının olumlu yönde teşkilinde (meFkEaI dahilinde gastrointestinal bulgular 0-3 arasında değişkenlerin iz düşümü) yine çoklu suş probiyoterapi uygulamasına bağlı olarak (her ne kadar ölçülemez de), bütirik asit konsantrasyonunun yükselebileceği (Paturi ve ark., 2012) öne sürülebilir. Bununla birlikte çalışmamızda seçilen suşlar; bağırsak duvarının savunmasını güçlendirmek üzere sıkı/ara bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu arttırmış (Cresci ve ark., 2014; Peng ve ark., 2009), böylelikle dolaşıma salınan bakteriyel komponentler olan lipopolisakkaridlerin translokasyonu sonrası şekillenen proinflamatuvar cevapta azalmaya (Cani ve ark., 2008; de La Serre ve ark., 2010) sebep olmuş da olabilir.

Bifidobacterium spp. ve *Lactobacillus spp.* genusuna dahil olan mikrobiyota üyeleri genel olarak güvenli ve gi kanalda artışları ile birlikte konakçı yararına olan unsurlardır. Yapılan bir çalışmada uygulanan *L. plantarum* ZLP001 suşu, enterotoksijenik *Escherichia coli*'nin bağırsak geçirgenliğinde artışı azaltmış, TJ proteinleri olan claudin-1, occludin ile ZO-1 seviyelerindeki azalmayı da hafifleterek proinflamatuvar sitokinlerden IL-6, IL-8 ve TNF α ekspresyonunu aşağı yönde regüle etmiştir (Wang ve ark., 2018). Aynı çalışmada ayrıca *L. plantarum* ZLP001 suşunun intestinal bariyer fonksiyonlarını olumlu yönde değiştirerek bağırsak epitelyumunu güçlendirmiş ve bağırsak mikrobiyotasını modüle etmiştir. Domuz yavrularında yapılan bu çalışmada elde edilen bütirat üreten bakterilerden *Anaerotruncus* ve *Faecalibacterium* sayılarındaki artış ve buna karşın epiteliyal inflamasyona yol açan *Clostridium sensu stricto* 1 hücresel yoğunluğunda azalmanın, *L. plantarum* ZLP001 suşunun etkinliğine bağlı olarak geliştiği düşünülmüştür (Wang ve ark., 2018). İnsanlarda yapılan bir çalışmada benzer şekilde *L. plantarum* IS 10506 takviyesinin kısa zincirli yağ asit profilinin tamamına (asetat, propiyonat ve butirat) etki ettiği görülmüştür (Kusumo ve ark., 2019). *L. plantarum* 299v suşunun, antibiyotiklerin kolonik fermentasyon üzerinde oluşturduğu negatif etkileri azaltarak tersine çevirebildiği, *Clostridium difficile* ile ilişkili nüks edici karakterde ishallerde yararlı etki sağlayabileceği de bildirilmiştir (Wult ve ark., 2007). Çalışmamızda uyguladığımız çoklu probiyotik sağaltımında da kullanılan ve sağaltım protokolümüzde (Ural, 2019a; Ural, 2020b) yer alan *L. plantarum* diğer araştırmacıların bahsettiği gibi kolonik fermentasyon üzerine etki ederek, anti-inflamatuvar aktivitede bir artış sağlamış ve bu olgularımızda yarar göstermiş olabilir.

Çalışmamızın temel sağaltım moleküllerinden olan (mikrobiyom odaklı) *A. muciniphila* [bağırsak

mikrobiyotasının anaerobik üyesi] güncel olarak, yeni-jenerasyon probiyotik (Ashrafiyan ve ark., 2021) ya da 'Bağırsak Mikrobiyomu Rönesansı' olan medikal bir probiyotik (Pendulum Therapeutics) olarak adlandırılmaktadır. İlk olarak 2004'te izole edilen *A. muciniphila*, i) enerji depolanması, ii) insülin duyarlılığının artırılması, iii) insülineminin ve plazma total kolesterolünün azaltılması, iv) inflamasyonu kontrol altına alan endokanabinoidlerin intestinal seviyelerinin, bağırsak bariyer fonksiyonlarının ve bağırsak peptid sekresyonunun (insanda ve fare modelinde) artırılması gibi etkileri ile tüm vücutta metabolik faaliyetlerle etkileşimde bulunmaktadır (Everard ve ark., 2013; Depommier ve ark., 2019). Köpeklerde antibiyotik uygulamaları sonrası *A. muciniphila*'nın gi kanal ilişkili sistematik biyobelirteçler ve epiteliyal hasarlanma üzerine etkilerine yönelik olarak araştırmalar da mevcuttur (Jugan ve ark., 2018). Çalışmamız, oldukça güncel ve önemli olan *A. muciniphila*'nın, halen ülkemizde ve hatta şu an için dünyada rektal enema şeklinde kullanıldığı, ilk veya öncü çalışmalardan biri durumundadır.

Akkermansia-benzeri bakterilerin memeli bağırsak mikrobiyomu alemi içerisinde alfa- ve beta-dağılımına yönelik [sekans derinliğindeki kısıtlılıklar veya incelenen/örneklemi yapılan hayvanlarda varlığının tespit edilemeyişi] yeterince araştırma belirememektedir. Bunun yanı sıra *Akkermansia*'nın oldukça düşük prevalansa sahip olması ve kedi ile köpeklerin ince bağırsak mikrobiyomunda baskın üye olmayışı yapılan analizlerde tespit edilemeyişi açıklayan bir durum olabilir. Bu durum kedi ile köpeklerin ince bağırsak mukozal katmanının ince ve daha düşük ekojentiye sahip oluşuyla ilgili olabilir. Anılan faktörler biyokimyasal koşullar (safra mevcudiyeti vb.) gi kanalda mikrobiyel yaşamı kısıtlayıcı faktörlerdir. Özellikle köpekler ve kısmen de kedilerde yüksek oranda soy içi üreme söz konusu olduğundan, mikrobiyotaları yetiştiricilik faktörü ile içi içe geçmiş olabilir (Garcia-Mazcorro ve ark., 2020). Değişik üreticilerden temin edilen laboratuvar farelerinde oldukça farklı mikrobiyom ile karşılaşılmış, *Akkermansia spp.* mevcudiyetinde belirgin farklılar görülmüştür (Xiao ve ark., 2015). Kedi ile köpeklerde gerçekleştirilen fekal mikrobiyota analizlerinin pek çoğunda *Verrucomicrobia* belirlenemese de 12 sağlıklı kediden 1'inde çok düşük kümesel yoğunlukta (%0.01) *Akkermansia* saptanan araştırmalar mevcuttur (Handl ve ark., 2011). Yine güncel bir çalışmada evde bakılan 46 kediden %0.11'inde fekal *Verrucomicrobia* kümelenmesi tespit edilmiştir (Jha ve ark., 2020). Çalışmamızda analizi gerçekleştirilen 8 olgudan birisinde (6 nolu olgumuz), %0.5 oranında fekal *Verrucomicrobia* filumuna ait tespit yapılmış olup, diğer örneklerimizde ise %0 oranında belirlenmiştir. Çalışmamızda, *Verrucomicrobia*, c__*Verrucomicrobiae*, o__*Verrucomicrobiales*; f__*Akkermansia* nin [sırası ile filum, sınıf, sıra, aile ve genus düzeylerinde] 6 no'lu olguda %0.5 bağlı bollukta tespit edilmesi, *Akkermansia* nin kedilerde yapılacak mikrobiyom

analizlerinde doğal olarak bulunabileceğinin önemli bir işareti olabileceği kanaatine varılmıştır.

SONUÇ

İnsanlarda İBH'ye benzer şekilde kedilerde de bağırsak disbiozisin patojenik rol alabileceği ve çözümün bir parçasının öbiyotik dengenin sağlanması olabileceği, bu çalışmada ortaya koyduğumuz güçlü verilere [i] 8/10 olguda sağaltım öncesi bağırsak mikrobiyom analizleri, ii) klinik skorlarda belirgin gerilemeye eşlik edecek şekilde dışkı kompozisyonunun gözle görülür şekilde düzelmesi, iii) rektal enema ile uygulana probiyotik süşunun *Akkermansia muciniphila* dahil çoklu süş içermesi ve bu içeriğe karşı iyi yanıt alınması, iv) çalışmaya dahil edilen olguların 6-9 ay süren takip/monitörizasyon süreçlerinde olumsuz değişiklik, geriye dönüş ya da nüks gözlemlenmemesi, vb. sebeplerle] bağlı olarak ileri sürülmüştür. Kanaatimizce hastalığın kontrolünün kedilerde mikrobiyom odaklı sağaltım prensipleri ile de mümkün olabileceği, rektal enema ile başka, farklı ve yeni sağaltım modellemesinin (en azından bu çalışma kapsamına alınan) çalışmamızdaki kedilerde uyguladığımız hali ile büyük yarar sağlayacağı kanaatine varılmıştır. Non-patojenik minicanlıları içeren probiyotiklerin doğru süş tercihleri dahilinde bağırsakta öbiyotik dengenin tesisinde yararlı minicanlılar lehine pozitif etki ile dengeyi değiştirebileceği, mikrobeseysel unsurların emilimini geliştirebileceği ve tüm bu yönleri ile insanlarda İBH'da olduğu gibi (Bernstein, 2015; Hajela ve ark., 2015), kanatimiz ve öngörülerimizin yanı sıra elde ettiğimiz bulgularla kEnt'li kedilerde de hastalık aktivitesini olumlu yönde değiştirebileceği öne sürülebilir. Probiyotik enema ile yaptığımız önceki çalışmalarımızda (Ural ve ark., 2021; Ural ve ark., 2021) probiyotiklerin benzer şekilde hedef noktaya en yakın yerden bırakılmasının, mide asidi ile ve/veya safra asitleri ile temas riskini by pass etmesinin yanı sıra protokolda yer alan, *A. muciniphila* gibi yeni jenerasyon, obligat kemoorganotrofik ve mukus degrade eden yararlı bir bakteri için kolon'da ihtiyaç duyduğu optimum gelişim pH'sındaki ortama olanak sağlayacağı (6.5) (Geerlings ve ark., 2018), oldukça yakın kedi kolonu pH'sı [beslenmeye bağlı değişmeyle birlikte (6.2)], (Williams, 1965) ve bu yöntemin benzer tüm yararlı probiyotik minicanlıların maksimum etki göstermesine sebep olabileceği de düşünölmüştür.

Çıkar çatışması: Bu çalışmada çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Yazarların Katkı Oranı: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan etmişlerdir.

Etik izin: Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 64583101/2021/150 numara ile bu çalışmanın izni alınmıştır.

Finansal destek: Bu çalışmada finansal destek bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- Artis D.** Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature reviews immunology*, 2008;8(6):411-420.
- Ashida H, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C.** Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nature chemical biology*, 2012;8(1):36-45.
- Ashrafian F, Keshavarz Azizi Raftar, Shahryari, A, Behrouzi A, Yaghoubfar R, Lari A, Siadat SD.** Comparative effects of alive and pasteurized *Akkermansia muciniphila* on normal diet-fed mice. *Scientific reports*, 2021;11(1):1-13.
- Bernstein CN.** Treatment of IBD: where we are and where we are going. *Official journal of the American College of Gastroenterology. ACG*. 2015;110(1):114-126.
- Canani RB, Di Costanzo M, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A.** Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2011;17(12):1519.
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R.** Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-1481.
- Cresci GA, Bush K, Nagy LE.** Tributyrin supplementation protects mice from acute ethanol-induced gut injury. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2014;38(6): 1489-1501.
- de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartma AL, Rutledge JC, Raybould HE.** Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010;299(2):G440-G448.
- Dennis JS, Kruger JM, Mullaney TP.** Lymphocytic/plasmacytic colitis in cats: 14 cases (1985-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1993;202(2): 313-318.
- Dennis JS, Kruger JM, Mullaney TP.** Lymphocytic/plasmacytic gastroenteritis in cats: 14 cases (1985-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1992;200(11):1712-1718.
- Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, Cani PD.** Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nature medicine*. 2019;25(7):1096-1103.
- Everard A, Belzer C, Geurts, L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Cani PD.** Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2013;110(22):9066-9071.
- Falony G, De Vuyst L.** Ecological interactions of bacteria in the human gut. *Prebiotics and probiotics science and technology*. 2009;639.
- Falony G, Vlachou A, Verbrugghe K, Vuyst LD.** Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. *Applied and environmental microbiology*. 2006;72(12):7835-7841.
- Garcia-Mazcorro JF, Minamoto Y, Kawas JR, Suchodolski JS, de Vos WM.** *Akkermansia* and microbial degradation of mucus in cats and dogs: implications to the growing

- worldwide epidemic of pet obesity. *Veterinary sciences*. 2020;7(2):44.
- Geerlings SY, Kostopoulos I, De Vos WM, Belzer C.** *Akkermansia* muciniphila in the human gastrointestinal tract: when, where, and how?. *Microorganisms*. 2018;6(3):75.
- Gibson GR, Roberfroid MB.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*. 1995;125(6):1401-1412.
- Hajela N, Ramakrishna BS, Nair GB, Abraham P, Gopalan S, Ganguly NK.** Gut microbiome, gut function, and probiotics: Implications for health. *Indian Journal of Gastroenterology*. 2015;34(2):93-107.
- Halfvarson J, Brislaw CJ, Lamendella R, Vázquez-Baeza Y, Walters WA, Bramer LM, Jansson JK.** Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nature microbiology*. 2017;2(5):1-7.
- Hall EJ, German AJ.** Diseases of the small intestine. In: Ettinger SJ, Feldman EC., eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders. 2004; pp.1332–1378.
- Hamer HM, Jonkers DMAE, Venema K, Vanhoutvin SALW, Troost FJ, Brummer RJ.** The role of butyrate on colonic function. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2008;27(2):104-119.
- Handl S, Dowd SE, Garcia-Mazcorro JF, Steiner JM, Suchodolski JS.** Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS microbiology ecology*. 2011;76(2):301-310.
- Hart JR, Shaker E, Patnaik AK, Garvey MS.** Lymphocytic-plasmacytic enterocolitis in cats: 60 cases (1988-1990). *American Animal Hospital Association (USA)*. 1994.
- Jergens AE, Crandell JM, Evans R, Ackermann M, Miles KG, Wang C.** A clinical index for disease activity in cats with chronic enteropathy. *Journal of veterinary internal medicine*. 2010;24(5):1027-1033.
- Jergens AE, Moore FM, Haynes JS, Miles KG.** Idiopathic inflammatory bowel disease in dogs and cats: 84 cases (1987-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1992;201(10):1603-1608.
- Jha PN, Gomaa AB, Yanni YG, El-Saadany AEY, Stedtfeld, TM, Stedtfeld RD, Dazzo FB.** Alterations in the endophyte-enriched root-associated microbiome of rice receiving growth-promoting treatments of urea fertilizer and *Rhizobium* biofertilizer. *Microbial ecology*. 2020;79(2):367-382.
- Jugan MC, Rudinsky AJ, Gordon A, Kramer DL, Daniels JB, Paliy O, Gilor C.** Effects of oral *Akkermansia* muciniphila supplementation in healthy dogs following antimicrobial administration. *American journal of veterinary research*. 2018;79(8):884-892.
- Klijn A, Mercenier A, Arigoni F.** Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005;29(3):491-509.
- Kusumo PD, Maulahela H, Utari AP, Surono IS, Soebandrio A, Abdullah M.** Probiotic *Lactobacillus plantarum* IS 10506 supplementation increase SCFA of women with functional constipation. *Iranian Journal of Microbiology*. 2019;11(5):389.
- Larrosa M, Luceri C, Vivoli E, Pagliuca C, Lodovici M, Moneti G, Dolara P.** Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Molecular nutrition & food research*. 2009;53(8):1044-1054.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI.** Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006;124(4):837-848.
- Li J, Butcher J, Mack D, Stintzi A.** Functional impacts of the intestinal microbiome in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2015;21(1):139-153.
- Macfarlane GT.** The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. *The large intestine: physiology, pathophysiology and disease*. 1991;51-92.
- Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijs I, Eeckhaut V, Vermeire S.** A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014;63(8):1275-1283.
- Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, Wollam A, Gordon JI.** Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(14):5859-5864.
- Makras L, Falony G, Van der Meulen R, De Vuyst L.** Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharides and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain. *Journal of applied microbiology*. 2006;100(6):1388-1390.
- Makras L, Van Acker G, De Vuyst L.** *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700: 2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(11):6531-6537.
- Marsilio S.** Feline chronic enteropathy. *Journal of Small Animal Practice*, 2021;62(6):409-419.
- Marsilio S, Pilla R, Sarawichitr B, Chow B, Hill SL, Ackermann MR, Suchodolski JS.** Characterization of the fecal microbiome in cats with inflammatory bowel disease or alimentary small cell lymphoma. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-11.
- Morrison DJ, Mackay WG, Edwards CA, Preston T, Dodson B, Weaver LT.** Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate?. *British Journal of Nutrition*. 2006;96(3):570-577.
- Nagao-Kitamoto H, Kamada N.** Host-microbial cross-talk in inflammatory bowel disease. *Immune network*. 2017;17(1):1-12.
- Paturi G, Mandimika T, Butts CA, Zhu S, Roy NC, McNabb WC, Ansell J.** Influence of dietary blueberry and broccoli on cecal microbiota activity and colon morphology in *mdr1a*^{-/-} mice, a model of inflammatory bowel diseases. *Nutrition*. 2012;28(3):324-330.
- Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J.** Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *The Journal of nutrition*. 2009;139(9):1619-1625.
- Roberfroid MB, Van Loo JA, Gibson GR.** The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *The Journal of nutrition*. 1998;128(1):11-19.
- Scheppach W, Weiler F.** The butyrate story: old wine in new bottles?. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2004;7(5):563-567.
- Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M.** Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*. 2000;47:397-403.
- Tsukahara T, Iwasaki Y, Nakayama K, Ushida K.** Stimulation of butyrate production in the large intestine

of weaning piglets by dietary fructooligosaccharides and its influence on the histological variables of the large intestinal mucosa. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2003;49(6):414-421.

- Turner JR.** Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *The American journal of pathology*. 2006;169(6):1901-1909.
- Ural K, Erdoğan H, Erdoğan S, Camkerten İ, Şahin N.** Circulating Serum Zonulin Levels Before and After Probiotic Enema Treatment in Dogs with Atopic Dermatitis: Randomized Clinical Study *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*. 2021a;12(2):70-8
- Ural K, Erdoğan S, Balıkçı C, Erdoğan H.** İnovatif Gastroentero-Dermatoloji Kapsamında Muhtelif Yöntem Geliştirme I: *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus paracasei* ile Probiyotik Eneması Atopik Dermatitli Köpeklerde Anti-Pruritik Etkinlik Sağlar Mı? *Van Vet J*. 2021b;32(2):74-81
- Ural K, Gültekin M, Erdoğan H, Erdoğan S, Gul G, Türk E.** Kısa Dönem Değişmeli Takvim Probiyotik Sağaltımıyla Atopik Dermatitli Köpeklerde Kaşıntı Giderilebilir mi? *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*. 2020a;11(1):1-8
- Ural K.** Küçük hayvan hekimliğinde dermatoloji alanında yeni dönem: bağırsak-beyin-deri eksen-i ve II. Uluslararası Vetexpo Veteriner Bilimleri Kongresi Sözlü sunumları. 20-22.09.2019. İstanbul. 2019a.
- Ural K.** Veteriner İç Hastalıklarında Probiyotikler: Probiyotik Kullanımı rehber Kitabı ve Olgu Atlası. Atalay konf. ve Matb., Ankara. 2020b; pp. 200.
- Van der Meulen R, Avonts L, De Vuyst L.** Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(4):1923-1930.
- Walker AW, Lawley TD.** Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacological research*. 2013;69(1):75-86.
- Wang J, Ji H, Wang S, Liu H, Zhang W, Zhang D, Wang Y.** Probiotic *Lactobacillus plantarum* promotes intestinal barrier function by strengthening the epithelium and modulating gut microbiota. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:1953.
- Williams S.** Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *Journal of Pathology and Bacteriology*. 1965;89(1):95-122.
- Wong JM, De Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins, DJ.** Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology*. 2006;40(3):235-243.
- Wult M, Hagslatt MLJ, Odenholt I, Berggren A.** *Lactobacillus plantarum* 299v enhances the concentrations of fecal short chain fatty acids in patients with recurrent *clostridium difficile* associated diarrhea. *Dig Dis Sci*. 2007;52:2082-2086.
- Xiao L, Feng Q, Liang S, Sonne S B, Xia Z, Qiu X, Kristiansen K.** A catalog of the mouse gut metagenome. *Nature biotechnology*. 2015;33(10):1103-1108.

The Effect of Clinoptilolite (Zeolite) Administration on Abomasal Emptying Rate in Calves

Abdurrahman Kürşat ÖZSOY¹, Tahir ÖZALP¹, Hasan ERDOĞAN^{1*}

¹ Aydın Adnan Menderes University, Veterinary Faculty, Department of Veterinary Internal Medicine, 09100, Aydın, Turkey

ABSTRACT

The planned research aimed to determine the effect of clinoptilolite (zeolite), which is known to have preventive and therapeutic effects against diarrhea in calves, on the abomasal emptying rate. In this context, the Holstein breed neonatal calves of both sexes were divided into two equal groups (n=7). Zeolite (1 g/kg) and acetaminophen (50 mg/kg) were added to the milk of the calves in the zeolite group, and only acetaminophen was added to the control group. Blood samples were taken at 0. minutes before the application and 30., 60., 90., 120., 180., 240., and 300. minutes after the application. Considering the changes in plasma acetaminophen concentrations in time-dependent plasma levels, it was determined that there were no significant changes at the end of the study between the zeolite and control group calves. On the other hand, when the time to reach the maximum concentration of both groups was examined, it was observed that the Tmax time was significantly lower than the calves in the control group, and the acetaminophen absorption was higher in the calves treated with zeolite. Abomasal emptying time was insignificantly shorter in zeolite-treated calves compared to control group calves. It was determined that zeolite, which has a prophylactic and therapeutic effect against diarrhea, does not have a negative effect on abomasal emptying and is a safe agent to use.

Keywords: Abomasal emptying, Acetaminophen, Calf, Clinoptilolite, Zeolite

Buzağılarda Klinoptilolit (Zeolit) Uygulamasının Abomazal Boşalma Oranına Etkisi

ÖZ

Planlanan çalışmada buzağı ishallerinde koruyucu ve tedavi etkinliği bilinen klinoptilolitin (zeolit)' in abomazal boşalma oranına etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Bu kapsamda holstein ırkı, her iki cinsiyetten, süt emme dönemindeki buzağılardan eşit sayıda (n=7) 2 grup olarak belirlendi. Zeolit grubunda bulunan buzağılara süt içerisine zeolit (1 gr/kg) ve asetaminofen (50 mg/kg) ilavesi, kontrol grubuna ise yalnızca asetaminofen ilavesi yapıldı. Kan örnekleri uygulama öncesi 0. dk ve uygulama sonrası 30., 60., 90., 120., 180., 240. ve 300. dakikalarda olacak şekilde alındı. Plazma asetaminofen konsantrasyonlarının zamana bağlı plazma seviyelerinde değişimler göz önüne alındığında, zeolit ve kontrol grubu buzağuları arasında çalışma sonunda anlamlı değişimlerin bulunmadığı belirlendi. Diğer taraftan her iki grubun maksimum konsantrasyona ulaşma süreleri incelendiğinde Tmax süresinin kontrol grubunda bulunan buzağılara göre anlamlı derecede düşük olduğu ve zeolit uygulanan buzağılarda asetaminofen emilimin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Zeolit uygulanan buzağılarda abomazal boşalma zamanı kontrol grubu buzağularına göre istatistiksel önem oluşturmayacak seviyede daha kısa sürede gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu nedenle ishale karşı profilaktik ve terapötik etkisi bulunan zeolitin, abomazal boşalma üzerine olumsuz bir etki oluşturmadığı ve güvenle kullanılabilir bir ajan olduğu söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Abomazal boşalma, Asetaminofen, Buzağı, Klinoptilolit, Zeolit

To cite this article: Özsoy AK, Özalp T, Erdoğan H. The Effect of Clinoptilolite (Zeolite) Administration on Abomasal Emptying Rate in Calves Kocatepe Vet J. (2023):16(1):31-37

Submission: 08.11.2022 Accepted: 09.02.2023 Published Online: 25.02.2023

ORCID ID; AKÖ: 0000-0001-9006-3395, TÖ: 0000-0002-9873-0364, HE: 0000-0001-5141-5108.

*Corresponding author e-mail: hasan.erdogan@adu.edu.tr

GİRİŞ

Ruminant beslemede yaygın olarak kullanılan klinopitolit (zeolit) birçok alanda önemli faydalar sağlamaktadır. Zeolitin özellikle detoksifiye edici (mikotoksinler ve ağır metaller dahil), antioksidan, hemostatik, ishal önleyici, büyümeyi teşvik edici, antiviral, antibakteriyel ve immün sistemi uyarıcı ajan olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Pavelić ve ark, 2001; Valpotic ve ark, 2016). Klinopitolitler süt ineklerinde metabolik, endokrin ve antioksidatif mekanizmayı modüle etmesine bağlı olarak sağlık ve üreme ile ilişkili parametreleri iyileştirdiği ve süt verimi gibi birçok parametre üzerinde olumlu etki yaptığı bildirilmektedir (Karatzia ve ark, 2013).

Abomazal boşalma (AB), abomazumun içeriğinin pylorusun açılmasıyla meydana gelen koordineli kasılmalarla duodenuma taşınmasından sorumlu olan pylorik antruma taşınmasıdır. Duodenumun başlangıcıyla birleşerek içerik intestinal sistemde daha ilerilere taşınır (Malbert ve Ruckebusch, 1988, 1991; Ruckebusch ve Pairet, 1984). Abomazum motilitesi ve boşalması, nöronal ve hormonal mekanizmalarla sağlanmaktadır. Buzağılarda beslenme stratejisindeki bu gelişmeler, gıdanın bağırsaklara geçene kadar abomazumda kaldığı süreyi ifade eden AB süresini etkilemektedir. Abomazal geçiş süresini uzatan beslenme stratejilerinin etkisiyle gıdanın daha fazla abomazumda kalması gastrointestinal gaz oluşumu ve şişkinliğin oluşmasına ortam sağlayabilmektedir (Songer ve Miskimins, 2005). Gastroparezis ya da midedeki boşalmanın gecikmesi beşeri hekimlikte daha ayrıntılı olarak tanımlanmakta ve gastroözefagal reflüks, abdominal ağrı, kusma, şişkinlik ya da iştahtaki azalma gibi multifaktöriyel anormalliklerle ilişkilendirilmektedir (Pasricha ve Parkman, 2015). Süt ikame yemleri ile beslenen buzağuların beslenme için aldıkları miktar, besin içerikleri ve sindirim düzeylerinde farklılıkların bulunmasına bağlı olarak süt ile beslenen buzağular ile kıyaslandığında, süt ikame yemleri ile beslenen buzağılarda sindirim problemlerinin daha yaygın olduğu bildirilmektedir (Constable ve ark, 2006; Marshall, 2009). Abomazal boşalma hızı (ABH); tüketilen yemin hacmi, osmalaritesi, motilitesi, luminal basınç abomazal duvar kontraksiyonları, içeriğin viskozitesi, antraduodonal koordinasyon ile pylorik direnç gibi birçok faktörden etkilenebilmektedir (Thomas ve ark, 1934; Thomas, 1957; Schulze- Delrieu ve Brown, 1985). Birçok yöntem buzağılarda AB' in belirlenmesinde kullanılabilir. Abomazal boşalmanın belirlenmesinde genellikle; direkt, indirekt, invaziv ve non- invaziv yöntemler kullanılmakta olup nadiren uygulaması sınırlı olan Nükleer sintigrafi gibi deneysel yöntemlerde kullanılmaktadır. Asetaminofen absorpsiyonun ortaya çıkması/ anlaşılması süttten kesilmemiş buzağılardaki eliminasyon hızından çok daha hızlıdır. Maksimal asetaminofen konsantrasyonu (Cmax) ve

maksimal asetaminofen konsantrasyon zamanı (Tmax) oral alımı takiben abomazal boşalma hızına bağlı olarak değişir. Asetaminofen absorpsiyonu sütle beslenen buzağılarda abomazal boşalmanın ölçümünde kullanıldığı bildirilmiştir ve Tmax düzeyi boşalma hızı bakımından en doğru bilgiyi vermektedir (Marshall ve ark, 2005).

Planlanan çalışma ile buzağılarda ishale karşı koruyucu ve tedavi edici etkinliği bilinen zeolit'in AB oranına etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Çalışmanın hayvan materyalini; holştayn ırkı, her iki cinsiyetten, süt emme dönemindeki (10-20 günlük) sağlıklı olduğu belirlenen buzağular oluşturdu. Buzağular genel klinik muayene bulguları ve laboratuvar bulguları temelinde yapılan incelemeler sonunda seçildi. Sağlıklı olduğu belirlenen (n=14) buzağular çalışmaya alınarak süt içerisine zeolit ve asetaminofen ilavesi yapılan (Grup I, n=7) ve yalnızca asetaminofen ilavesi yapılan hayvanlar (Grup II, n=7) olacak şekilde iki gruba ayrıldı. Her iki gruba da seçimleri yapılan hayvanların uygulama sonrası genel sağlık muayeneleri kapsamında kalp vuruş sayısı, solunum sayısı ile birlikte perianal bölge temizlik skorları kayıtları gerçekleştirildi.

Çalışma kapsamında değerlendirilmeye alınan hayvanlar akşam süt emme işleminin ardından 12 saat boyunca aç bırakıldı ve ad libitum su alımı dışında herhangi bir oral uygulama yapılmadı. Grup I' de bulunan buzağuların biberonlarına süt ile zeolit (1 gr/kg, Natmin 9000, Türkiye), (Ural ve diğerleri, 2016), ve asetaminofen (50 mg/kg) (Parol tablet, Atabay Kimya San. ve Tic. AŞ, İstanbul, Türkiye) karıştırıldıktan sonra besleme işlemi gerçekleştirildi. Grup II' de yer alan buzağılarda benzer şekilde 12 saatlik açlık gerçekleştirildikten sonra içeceği sütün içerisine asetaminofen (50 mg/kg, Marshal ve ark, 2005) ilavesi yapılarak besleme işlemi gerçekleştirildi.

Sağlıklı olarak çalışmaya dahil edilen kontrol grubu ve zeolit grubundaki buzağılardan kan örnekleri besleme işlemi başlamadan hemen önce (0. dk) ve besleme işlemi gerçekleştirildikten sonraki 30, 60, 90, 120, 180, 240 ve 300. dakikalarda tekniğine uygun olarak *V.jugularis* üzerinden IV katater yardımı ile gerçekleştirilip her seferinde 2 mL olacak şekilde lityum heparin ihtiva eden tüplere (BD®, Türkiye) alındı.

Örnekler 3500 dev/dk da santrifüj (Hettich, Almanya) edilip elde edilen plazma örnekleri ayrıştırılıp ependorf tüplere aktarıldı. Tüm plazma örnekleri analiz yapılıncaya kadar -20 °C saklandı.

BULGULAR

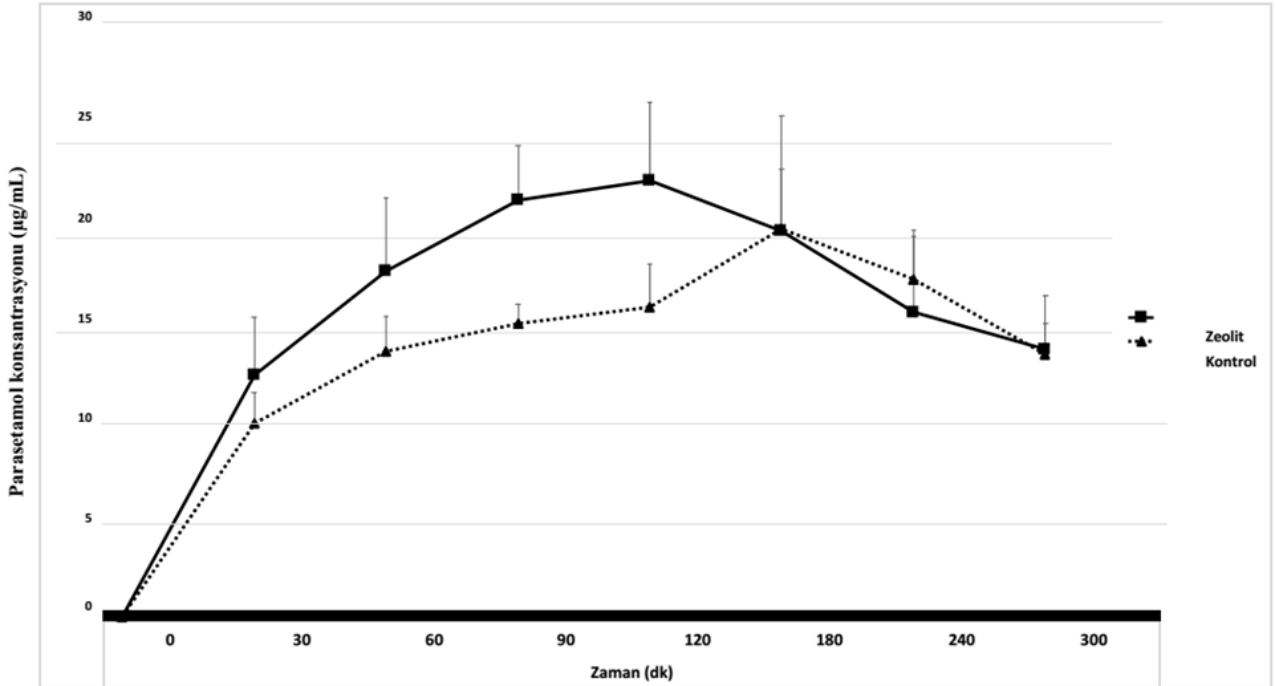
Asetaminofen ölçümlerinin gerçekleştirilmesi amacı ile plazma örnekleri maksimum iki hafta süre ile saklandı. Ölçümler spektrofotometrik analiz metodu prensibine dayalı olarak otoanalizör (Randox, İngiltere) yardımı ile ticari test kitleri (Cambridge Life Sciences, İngiltere, LOT: 21690) kullanılarak üretici firmanın tanımladığı şekilde gerçekleştirildi.

Planlanan çalışma kapsamında elde edilen veriler ortalama ve standart sapma olarak tanımlandı. Maksimum plazma asetaminofen konsantrasyonu (Cmax), maksimum plazma asetaminofen konsantrasyonu zamanı (Tmax) ve eğrinin altındaki konsantrasyon alanı (AUC) farklı zaman dilimlerinde olacak şekilde her iki grupta da belirlendi. Farmakokinetik parametrelerin belirlenmesinde Pksolver (Zhang ve ark, 2010) programından yararlanıldı. Abomazal boşalma oranlarının karşılaştırılmasında Cmax, Tmax ve AUC değerlerinin karşılaştırılmasından yararlanıldı. Bu kapsamda her iki gruptan elde edilen verilerin değerlendirilmesinde T testinden yararlanılarak non-parametrik Mann-Whitney U testi ile sonuçların sağlamaları gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler SPSS 24.0 (IBM, Amerika) programından yararlanılıp, $p < 0,05$ değeri istatistiksel anlamlı olacak şekilde kabul edildi.

Uygun şartlarda bekletilen buzağuların kalp atımı, solunum sayısı, beden ısısı gibi klinik parametreleri yanı sıra dışkı skorları belirlenerek kayıt altına alındı. Bu kapsamda buzağuların her iki grupta da beden ısılarının ortalama $38,7^{\circ}\text{C}$ olduğu kalp frekanslarının ortalama $120,4$ vuruş/dk seviyesinde seyrettiği belirlendi. Çalışma gruplarında bulunan buzağuların hemen tamamının dışkılarının katı kıvamda olduğu ve ortalama 2 saatte bir kez dışkılama gerçekleştirdiği perianal bölgelerinin dışkı ile kirlenmemiş olduğu tespit edildi. Klinik muayenelerin hemen akabinde alınan 0. dk kan örneklerindeki hematolojik değerlendirmelerde buzağuların sağlıklı oldukları belirlendi.

Araştırmada kullanılan buzağuların klinik değerlendirmeleri her örnekleme zamanlarında (30, 60, 90, 120, 180, 240 ve 300.dk) tekrar edildi ve özellikle dışkılama sürelerinde ve dışkı kıvamlarında değişimin olmadığı belirlendi. Deneysel çalışma aşamasının ve örnekleme işlemlerinin sonunda buzağuların tamamında genel durumlarında bozulmayı tanımlayan herhangi bir klinik tabloya rastlanmadı.

Çalışmamız sonucunda elde edilen asetaminofen absorpsiyon testi sonuçlarının farmakokinetik değerlendirmelerinde maksimum konsantrasyon (Cmax), maksimum konsantrasyona ulaşma süresi (Tmax) ve eğri altında kalan AUC değerlerine ait veriler Şekil 1 ve Tablo 1'de sunuldu.



Şekil 1. Plazma asetaminofen konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimi (Ort \pm SH)

Figure 1. Time-dependent variation of plasma acetaminophen concentrations

Söz konusu farmakokinetik parametreler incelendiğinde, zeolit uygulanan ve kontrol grubu buzağlarında Cmax değerlerinin zeolit uygulanan grupta daha yüksek olduğu ancak her iki grup arasındaki farklılığın istatistiksel bir öneminin ($p>0.05$) bulunmadığı belirlendi. Her iki grupta bulunan buzağların maksimum konsantrasyona ulaşma

süreleri incelendiğinde ise zeolit uygulamasının Tmax süresinin kontrol grubu buzağlarına göre anlamlı derecede ($p=0.038$) düşük olduğu ve zeolit uygulanan buzağlarda asetaminofen emiliminin daha hızlı bir şekilde yüksek konsantrasyonlarda şekillendiği tespit edilmiştir

Tablo 1. Zeolit kullanılan buzağlarda abomazal boşalma zamanına ait farmakokinetik veriler
Table 1. Pharmacokinetic data of abomazal emptying time in zeolite-treated calves.

	Kontrol (n=7)	Zeolit (n=7)	P değeri
	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	
C max ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	20,97 \pm 1,12	24,63 \pm 1,76	0,128
T max (dk)	175,71 \pm 16,60	120,0 \pm 11,34	0,038
AUC 60 ($\mu\text{g} \cdot \text{dk}$) /mL	516,54 \pm 24,81	656,7 \pm 53,55	0,073
AUC 90 ($\mu\text{g} \cdot \text{dk}$) /mL	959,16 \pm 36,78	1260,11 \pm 89,82	0,017
AUC 120 ($\mu\text{g} \cdot \text{dk}$) /mL	1436,34 \pm 51,10	1935,66 \pm 123,10	0,007
AUC 180 ($\mu\text{g} \cdot \text{dk}$) /mL	2540,46 \pm 96,11	3238,39 \pm 218,24	0,026
AUC 240 ($\mu\text{g} \cdot \text{dk}$) /mL	3689,34 \pm 148,30	4331,59 \pm 321,41	0,097
AUC 300 ($\mu\text{g} \cdot \text{dk}$) /mL	4640,08 \pm 186,61	5237,12 \pm 392,19	0,259

Asetaminofen konsantrasyonlarının AUC300 [$\mu\text{g} \cdot \text{dk}/\text{mL}$] değerlerinde istatistiksel anlamlı bir farklılığın bulunmadığı tespit edilmesine rağmen özellikle AUC90, AUC120, ve AUC180 dakikalardaki ölçümlerinin zeolit uygulanan grupta anlamlı ($p<0.05$) derecede yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 1, Şekil 1).

TARTIŞMA

Zeolit mineralleri anyonik ve katyonik yapılarda iyi tanımlanan üzerinde boşluklar ve kanallar ihtiva eden absorban niteliği yüksek gözenekli hidratlı aminosilikat yapıda mikroporöz doğal bileşiklerdir (Sangeetha ve Baskar, 2016). Bu yapısından dolayı kirli suların arıtılması, kataliz süreçleri, nükleer atıkların bertarafı, ziraat, yem katkı maddeleri ve diğer biyokimyasal uygulamalar gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Sangeetha ve Baskar, 2016). Zeolitinin özellikle medikal anlamda kullanılan formunun iyon değişimi ve absorpsiyon kapasitesi nedeni ile klinoptilolit olduğu ifade edilmektedir (Mumpton, 1999; Nadziakiewicz ve ark, 2019). Klinoptiloliti eşsiz kılan bu özelliklerinin başında iyon değişim kapasitesinin yüksekliği toksik ajanların uzaklaştırılması olarak nitelendirilmektedir. Ruminant sahada sütçü sığırlarda klinoptilolit kullanımına bağlı olarak rumen fermentasyon süreçlerinin regüle

edildiği ve besin bileşenlerinin absorpsiyonunda olumlu yönde değişimleri beraberinde getiren sonuçların yansımaları ifade edilmektedir (Dschaak ve ark, 2010). Bu özelliklerinin yanında inflamasyon süreçlerine de etki ettiği, akut enflamasyon süreçlerinde ve immün yanıt ile ilişki içerisinde bulunan komplement 3, FN1, protrombin, alfa 1B glikoprotein, haptoglobulin, seruloplazmin, beta-2-glikoprotein 1 gibi parametrelerin değerlendirildiği araştırmada klinoptilolit ile beslenen sığırlarda söz konusu biyobelirteçlerin seviyelerinin düşük seyrettiği belirlenmiştir (Maity ve ark, 2021).

Ruminantlar açısından neonatal dönem olarak kabul edilen doğumdan sonraki ilk 21 günlük süre içerisinde buzağı ishalleri ve ishale bağlı doğan sonuçlar yetiştiricilerin ekonomik anlamda bu dönemi yönetmesini zorlaştırmaktadır (Constable ve ark, 2021). Yapılan son çalışmalarda ishalin tedavisinden çok profilaktik uygulamaların önem kazandığı bu amaç doğrultusunda Klinoptilolit gibi medikal önemi yüksek ajanlarında da yetiştiricilik anlamında profilaktik aşamalarda yalnızca yem katkısı olarak erişkin sığırlarda değil, buzağlarda da ishalin yönetimi anlamında kullanılmaya başlandığı gözlemlenmektedir (Grce ve Pavelic, 2005; Cerbu ve ark, 2020). Ayrıca buzağlarda neonatal dönemde önem arz eden pasif transfer immunitesi üzerinde zeolitinin olumlu yönde

etki ettiği bildirilmektedir (Marc ve ark, 2018). Araştırmamız kapsamında kullanılan buzağular profilaktik amaçla daha önce klinoptilolit kullanılan buzağulardan seçilmemiş olup ilk uygulamanın nasıl bir etki doğurduğunun belirlenmesi üzerine kurgulanmıştır. Bu kapsamda buzağulara uygulanan klinoptilolit sonrasında dışkı kıvamında bir değişim olmadığı klinik olarak da gerek kalp atımlarında gerekse de solunum sayılarında fark edilebilir değişimlerin bulunmadığı tespit edilmiştir. Konu ile ilgili yapılmış araştırmalar incelendiğinde eritromisin ve betanekol uygulamalarının ishelli buzağularda uygulanması sonrasında dışkı kıvamının daha da kötüleştiği ve dışkılama sıklığının arttığı prematüre buzağularda ise dışkılamının uygulamanın akabindeki 180. dakikada başladığı belirtilmektedir (Engin, 2014). Benzer şekilde buzağularda değişen dozlarda sisaprid, betanekol ve her iki ilacın kombine halde kullanımlarında da buzağuların araştırmanın 180. dakikasından sonra ishal durumunun gözlemlendiği rapor edilmektedir (Güzelbekteş ve ark, 2017). Araştırmamız sonuçları ile kıyaslandığında klinoptilolit uygulanan buzağuların dışkı kıvamlarında bir değişim belirlenmediği herhangi bir ishal tablosunun şekillenmediği tespit edilmiştir. Bu farklılık klinoptilolit zaten ishal oluşumunu engelleyen ve yukarıdaki çalışmalarda da bahsedilen absorban özelliklerinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Abomazal motilite bozuklukları sütçü sığırlarda yaygın olarak görülmekte ve etiyolojisinde sıklıkla yetişkin sığırlarda abomazumun sola deplasmanı, abomazal volvulus ve abomazal şişkinlik rol oynarken, buzağularda ise abomazal timpani abomazumun motilitesinde bozukluklarına yol açabilmektedir (Constable ve ark, 1992). Abomazal motilite bozukluklarında prokinetik ajanların kullanılabilirliği ve bu kapsamda da eritromisin, neostigmin, bethenekol ve metoklopromid gibi ajanların gastrointestinal motilitenin azaldığı durumlarda sağaltıma yardımcı olabildiği bildirilmektedir (Dardillat ve Ruckebusch, 1973; Braun ve ark, 1990; Roussel ve ark, 1994; Wittek ve ark, 2008). Abomazal boşalma zamanının değerlendirildiği çalışmalar incelendiğinde özellikle eritromisinin bilinen prokinetik özelliklerinin bulunması ile ilişkili olarak çalışma grupları içerisinde negatif kontrol grubu olarak tanımlandığı görülmektedir (Nouri ve ark, 2008; Shabboie ve Ghane, 2022). Araştırmamız kapsamında abomazal boşalma üzerine etkinliği değerlendirilen ve klinoptilolit üzerine planlanan çalışmada gruplandırma işlemi sırasında yalnızca kontrol ve klinoptilolit gruplarının oluşturulması çalışmayı kısıtlayan bir faktör olarak değerlendirilmiştir. Güncel çalışmalar göz önüne alındığında söz konusu gruplara eritromisin gibi prokinetik etkinliği bilinen (Dardillat ve Ruckebusch, 1973; Braun ve ark, 1990; Roussel ve ark, 1994; Wittek ve ark, 2008) bir negatif kontrol grubun daha eklenmesinin karşılaştırmalı sonuçların yorumlanmasına yardımcı olabilecektir.

Çalışma kapsamında 1 gr/kg dozda uygulanan klinoptilolit abomazal boşalma zamanı üzerine olan etkileri asetaminofen absorpsiyon testi ile belirlenmiştir. Bu kapsamda değerlendirilen farmakokinetik parametreler incelendiğinde Cmax değerinin klinoptilolit uygulanan grupta daha yüksek olduğu ancak Cmax değerleri açısından her iki grupta da istatistiksel anlamlı değişimlerin bulunmadığı tespit edildi. Gruplar arasında maksimum konsantrasyona ulaşma süreli incelendiğinde ise klinoptilolit uygulanan buzağularda Tmax süresinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu ve asetaminofen emiliminin hızlı bir şekilde gerçekleştiği tespit edildi. Eğrinin altında kalan alan açısından ise AUC300 [$\mu\text{g}\cdot\text{dk}/\text{mL}$] değerinde anlamlı farklılığı bulunmadığı ancak AUC90, AUC120, ve AUC180. dakikalardaki ölçümlerinin zeolit uygulanan grupta anlamlı ($p<0.05$) derecede yüksek olduğu tespit edildi. Söz konusu değişimler değerlendirildiğinde klinoptilolit uygulamasının abomazumdaki boşalmayı kısmen hızlandırdığı belirlendi. Ancak AUC300. dakika dikkate alındığında gruplar arasında anlamlı bir fark olmaması, abomazal boşalma zamanındaki değişimler ile ilişkili olarak klinik yansımaların şekillenmemesini açıklayabilir. Eritromisin, tilozin ve tilmikosin kullanıma bağlı olarak abomazal boşalma hızının arttığı ve söz konusu ajanların prokinetik etkilerinin belirlendiği araştırmada kontrol grubuna göre Cmax değerlerinde istatistiksel bir farklılığın bulunmadığı Tmax değerlerinin ise belirgin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük seyrettiği belirlenmiştir (Nouri ve Constable, 2007). Benzer şekilde parenteral gentamisin ve eritromisin uygulanan buzağularda da Tmax değerlerinin anlamlı derecede kontrol grubuna kıyasla düşük olduğu tespit edilmiştir (Nouri ve ark, 2008). Araştırmamız kapsamında da yukarıda atfedilen çalışma sonuçlarına benzerlik gösterecek şekilde Cmax konsantrasyonlarında anlamlı farklılıklar bulunmaz iken Tmax sürelerinde istatistiksel anlamlı azalmaların bulunduğu tespit edilmiştir. Abomazal boşalmanın yalnızca makrolit grubu antibiyotiklerin yanında monogastrik hayvanlarda gastrokinetik etkileri ile bilinen metakloropamid ve neostigmin ile yapılan karşılaştırılmasında, neostigmin ve metakloropamidin abomazal boşalma zamanında anlamlı derecede değişimlere neden olmadığı belirtilmektedir (Wittek ve Constable, 2005). Metakloropamidin belirlenen etkisinin monogastrik hayvanlardan farklı olarak doza bağımlı buzağularda şekillenen sentral etkiler nedeni ile olduğu belirtilmektedir (Zdelar ve ark, 1979; Guard ve ark, 1988; Wittek ve Constable, 2005). Benzer şekilde araştırmamız sonuçları ile karşılaştırıldığında çok farklı dozlarda kullanım potansiyeline sahip olan klinoptilolit farklı dozlar temelinde gruplandırılarak yeni çalışmalarla doza bağımlı değişimlerinin değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak klinoptilolit 1g/kg dozda sağlıklı buzağulara oral uygulanmasının abomazal boşalma

zamanını kısmi düzeyde, olumsuz bir klinik tablo oluşturmayacak şekilde hızlandırdığı tespit edilmiştir. Söz konusu tablo pratik sahada ishalin profilaksisi ve sağaltımında kullanılan klinoptilolit bulağlarda abomazal boşalma üzerine olumsuz bir klinik etkinlik ortaya çıkarmadığı ve güvenle kullanılabilir bir ajan olduğunu göstermektedir. İleride gerçekleştirilecek çalışmalarda prokokinetik etkileri bulunan diğer etken maddelerin de dahil edilerek farklı dozlarda farklı Zeolit (doğal/sentetik) formları ya da alüminyum silikat bileşenlerinin eklendiği daha fazla grupla karşılaştırmalı sonuçlarının değerlendirilmesinin fayda sağlayabileceği düşünülmektedir.

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

Etik İzin: Bu çalışma ADÜ HADYEK 64583101/2020/082 sayı ve 17.09.2020 tarih ile izin almıştır

Finansal Destek: Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF – 21002 proje numarası ile desteklenmiştir.

Yazarların Katkı Oranı: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan etmişlerdir.

Açıklama: Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda "Bulağlarda Klinoptilolit (Zeolit) Uygulamasının Abomazal Boşalma Oranına Etkisi" başlığı ile tamamlanan Yüksek Lisans Tezinin bir bölümünden özetlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Bell FR, Green AR, Wass JAH, Webber DE.** Intestinal control of gastric function in the calf: the relationship of neural and endocrine factors. *The Journal of Physiology*, 1981; 321(1), 603-610
- Braun U, Steiner A, Kaegi B.** Clinical, haematological and biochemical findings and the results of treatment in cattle with acute functional pyloric stenosis. *The Veterinary Record*, 1990;126(5), 107-110.
- Cerbu C, Ilaş VA, Czopowicz M, Potârniche AV, Bodart-Nieva EP, Mureşan EA, Pall E.** The use of activated micronized zeolite clinoptilolite as a possible alternative to antibiotics and chestnut extract for the control of undifferentiated calf diarrhea: An in vitro and in vivo study. *Animals*, 2020;10(12), 2284
- Constable PD, Miller GY, Hoffsis GF, Hull BL, Rings DM.** Risk factors for abomasal volvulus and left abomasal displacement in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 1992;53, 1184-1192
- Constable PD, Wittek T, Ahmed AF, Marshall TS, Sen I, Nouri M.** Abomasal pH and emptying rate in the calf and dairy cow and the effect of commonly administered therapeutic agents [Conference Presentation]. In *Proceedings of the XXIV World Buiatrics Congress*, Nice, France, 2006.
- Constable PD, Trefz FM, Sen I, Berchtold J, Nouri M, Smith G, Grünberg W.** Intravenous and oral fluid therapy in neonatal calves with diarrhea or sepsis and in adult cattle. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021;7, 603358.
- Dardillat C and Ruckebusch Y.** Aspects fonctionnels de la jonction gastroduodénale chez le veau nouveau-né. In *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1973;4(1), 31-56
- Dschaak CM, Eun JS, Young AJ, Stott RD, Peterson S.** Effects of supplementation of natural zeolite on intake, digestion, ruminal fermentation, and lactational performance of dairy cows. *The Professional Animal Scientist*, 2010;26(6), 647-654.
- Grce M and Pavelić K.** Antiviral properties of clinoptilolite. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2005; 79(1-3), 165-169
- Guard C, Schwark W, Kelton D, Dobson A.** Effects of metoclopramide, clenbuterol and butorphanol on ruminoreticular motility of calves. *The Cornell Veterinarian*, 1988;78(1), 89-98.
- Güzelbekteş H, Altunok V, Koç Y, Elmas M, Şen İ.** Sağlıklı bulağlarda yüksek ve düşük doz sisaprid ve betanekolün abomazum motilite ve boşalma oranına etkisi. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 2017;7(1), 1-11.
- Habel RE.** A study of the innervation of the ruminant stomach. *Cornell Veterinarian*, 1956;46, 555-633.
- Karatzia MA, Katsoulos PD, Karatzias H.** Diet supplementation with clinoptilolite improves energy status, reproductive efficiency and increases milk yield in dairy heifers. *Animal Production Science*, 2013;53(3), 234-239
- Kertz AF and Loften JR.** A historical perspective of specific milk-replacer feeding programs in the United States and effects on eventual performance of Holstein dairy calves. *The Professional Animal Scientist*, 2013;29(4), 321-332.
- Khan MA, Weary DM, Von Keyserlingk MAG.** Invited review: Effects of milk ration on solid feed intake, weaning, and performance in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 2011;94(3), 1071-1081.
- Maity S, Rubić I, Kuleš J, Horvatić A, Đuričić D, Samardžija M, Mrljak V.** Integrated metabolomics and proteomics dynamics of serum samples reveals dietary zeolite clinoptilolite supplementation restores energy balance in high yielding dairy cows. *Metabolites*, 2021;11(12), 842
- Marshall TS, Constable PD, Crochik SS, Wittek T.** Determination of abomasal emptying rate in suckling calves by use of nuclear scintigraphy and acetaminophen absorption. *American Journal of Veterinary Research*, 2005;66(3), 364-374.
- Marc S, Kirovski D, Mircu C, Hutu I, Otavă G, Paul C, Tulcan C.** Serum protein electrophoretic pattern in neonatal calves treated with clinoptilolite. *Molecules*, 2018;23(6), 1278
- Mumpton FA.** La roca magica: Uses of natural zeolites in agriculture and industry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999;96(7), 3463-3470.
- Nadziakiewicz M, Kehoe S, Micek P.** Physico-chemical properties of clay minerals and their use as a health promoting feed additive. *Animals*, 2019;9(10), 714.
- Nouri M, Hajikolae MR, Constable PD, Omid A.** Effect of erythromycin and gentamicin on abomasal emptying rate in suckling calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2008;22(1), 196-201.

- Pasricha PJ and Parkman HP.** Gastroparesis: definitions and diagnosis. *Gastroenterology Clinics*, 2015;44(1), 1-7.
- Pavelić K, Hadžija M, Bedrica L, Pavelić J, Đikić I, Katić M, Čolić M.** Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy. *Journal of Molecular Medicine*, 2001;78(12), 708-720
- Sangeetha C and Baskar P.** Zeolite and its potential uses in agriculture: A critical review. *Agricultural Reviews*, 2016;37(2), 101-108.
- Shabbooe Z and Ghane M. (2022).** Effect of erythromycin on abomasal emptying in suckling lambs with experimental endotoxemia. *Small Ruminant Research*, 2022;207, 106593.
- Songer JG and Miskimins DW.** Clostridial abomasitis in calves: Case report and review of the literature. *Anaerobe*, 2005;11(5), 290-294.
- Schulze-Delrieu K and Brown CK.** Emptying of saline meals by the cat stomach as a function of pyloric resistance. *American Journal of PhysiologyGastrointestinal and Liver Physiology*, 1985;249(6), 725-732.
- Thomas JE.** Mechanics and regulation of gastric emptying. *Physiological Reviews*, 1957;37(4), 453-474.
- Thomas JE, Crider JO, Mogan CJ.** A study of reflexes involving the pyloric sphincter and antrum and their role in gastric evacuation. *American Journalof Physiology-Legacy Content*, 1934;108(3), 683-700
- Roussel AJ, Brumbaugh GW, Waldron RC, Baird AN.** Abomasal and duodenal motility in yearling cattle after administration of prokinetic drugs. *American Journal of Veterinary Research*, 1994;55(1), 111-115
- Wittek T and Constable PD.** Assessment of the effects of erythromycin, neostigmine, and metoclopramide on abomasal motility and emptying rate in calves. *American Journal of Veterinary Research*, 2005;66(3), 545-552
- Wittek T, Tischer K, Körner I, Sattler T, Constable PD, Furl M.** Effect of preoperative erythromycin or dexamethasone/vitamin C on postoperative abomasal emptying rate in dairy cows undergoing surgical correction of abomasal volvulus. *Veterinary Surgery*, 2008;37(6), 537-544
- Zdelar F, Hahn V, Martinic B, Dzekov R.** Effect of the antiemetic metoclopramide on the digestive tract of fattening calves, and its use in digestive disorders. *Veterinarski Glasnik*, 1979;33, 761-766

The Effects of Supplemental Rumen Protected Lysine and Methionine on Some Metabolic Parameters in Holstein Heirs During Late Pregnancy

Özge ÇAKMAK¹, Hande Işıl AKBAĞ¹, Cangir UYARLAR^{2*}

¹Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, 17020, Çanakkale, Türkiye

²Afyon Kocatepe University, Veterinary Faculty, Department of Animal Husbandry and Animal Nutrition, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

ABSTRACT

Lysine and methionine are essential amino acids which have limiting effects on of growth and milk yield. Primiparous cows are still on their growth phase while starting first lactation. In this study, the effects of additional rumen protected lysine and methionine administration on some blood metabolism parameters in the last two months of pregnancy in heifers were investigated. Thirty Holstein dairy pregnant heifers were randomly divided into two as control and treatment. Control (K) heifers were fed by standard ration prepared in accordance with the NRC (2001), while Treatment heifers fed by a rumen protected lysine and methionine supplemented ration. Blood samples were taken from the tail vein (vena coccygea) of all animals at 15-day intervals and analyzed for glucose, Non-Esterified Fatty acids (NEFA), Beta Hydroxybutyric Acid (BHBA), total cholesterol (TC), triglyceride (Trig) and immunoglobulin G (IgG). As a result of the statistical evaluation, it was determined that rumen protected lysine and methionine supplementation did not have a statistically significant effect on blood glucose, NEFA, BHBA, TK, Trig and IgG concentrations in pregnant heifers. However, more comprehensive studies are needed to evaluate the differences seen in BHBA and glucose in some weeks and the numerical increase seen in IgG level in the treatment group.

Keywords: Holstein, IgG, Lysine, Metabolic Parameters, Methionine, Pregnant Heifer

Gebeliğin Son Dönemindeki Holştayn Düvelerde Rasyona Rumen Korunmalı Lizin Ve Metiyonin İlavesinin Bazı Metabolik Parametreler Üzerine Etkileri

ÖZ

Lizin ve metiyonin gerek büyüme ve gelişme gerekse süt verimi açısından sınırlayıcı etkiye sahip amino asitlerdir. İlk doğumunu yapan düveler bir taraftan laktasyona başlarken diğer taraftan hala büyüme ve gelişme çağındadırlar. Yapılan bu çalışmada ilk doğumunu yapacak olan düvelerde gebeliğin son iki ayında ilave olarak rumen korunmalı lizin ve metiyonin verilmesinin bazı kan metabolizma parametreleri üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmada otuz adet Holştayn ırkı sütçü gebe düve rastgele örnekleme metodu ile iki gruba ayrılmıştır. Kontrol (K) grubundaki düvelere NRC (2001) doğrultusunda hazırlanan standart bir rasyon verilmişken, uygulama (U) grubundaki düvelere ise rumen korunmalı lizin ve metiyonin takviyesi yapılmış bir rasyon uygulanmıştır. Çalışma esnasında 15'er gün aralıklarla tüm hayvanların kuyruk venasından (vena coccygea) kan örneği alınmıştır. Alınan kan örneklerine glukoz, esterleşmemiş yağ asitleri (NEFA), beta hidroksi bütirik asit (BHBA), total kolestrol (TK), trigliserid (Trig) ve immünoglobülin G (IgG) analizleri yapılmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda gebe düvelerde rumen korunmalı lizin ve metiyonin takviyesinin kanda glukoz, NEFA, BHBA, TK, Trig ve IgG konsantrasyonları üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Ancak uygulama grubunda bazı haftalarda BHBA ve glukozda görülen farklılıklar ile IgG seviyesinde görülen rakamsal artışın değerlendirilebilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Gebe Düve, Holştayn, IgG, Lizin, Metabolik Parametreler, Metiyonin

To cite this article: Çamak Ö, Akbağ H.I, Uyarlar C. The Effects of Supplemental Rumen Protected Lysine and Methionine on Some Metabolic Parameters in Holstein Heirs During Late Pregnancy. Kocatepe Vet J. (2023) 16(1):38-46

Submission: 30.06.2022 Accepted: 28.12.2022 Published Online: 03.03.2023

ORCID ID; ÖÇ: 0000-0002-1928-6892, HLA: 0000-0002-7325-4453, CU: 0000-0002-7803-2454

*Corresponding author e-mail: cangiruyarlar@hotmail.com

GİRİŞ

Damızlık süt sığırı işletmelerinde anaç sürüye dâhil edilen ikame düvelerin büyüme ve gelişme düzeyleri ile bunlardan elde edilen yaşam boyu verimlilik ve karlılık arasında sıkı bir ilişki vardır (Cady ve Smith 1996). Ancak sanılanın aksine büyüme ve gelişme rasyonun sadece enerji ve protein düzeyiyle ilişkili olmayıp hayvanlara enerji ve proteinin rasyonda dengeli bir şekilde verilmesi ile de ilişkilidir (senkronizasyon). Bu bağlamda rasyonun protein yapısı incelendiğinde optimum büyüme ve gelişme için rasyonda büyüme ve gelişmeyi doğrudan ilgilendiren esansiyel aminoasitler de yeterli düzeyde bulunmalıdır. Büyüme ve gelişmeyi doğrudan etkileyen en önemli esansiyel aminoasitler lizin ve metiyonindir (NRC 2001). Bununla birlikte bu iki aminoasitin süt verim parametreleri ile de sıkı ilişkileri vardır.

Gerek süt sığırları gerekse ikame düveler doğumdan birkaç gün öncesi ile doğumdan birkaç gün sonrası arasındaki kısa sürede çok büyük metabolik ve fizyolojik değişiklikler yaşamaktadırlar (Grummer 1996). Doğum öncesinde çok yüksek düzeyde kaba yem ve sindirilebilir madde açısından düşük bir diyetle beslenen düve ve süt sığırları doğum sonrasında hızla yükselen süt verimini karşılamak için çok yüksek düzeyde konsantre yem ve çok yüksek sindirilebilir besin maddesine sahip rasyonla beslenmeye başlarlar (Overton ve Waldron 2004). Buna rağmen rasyon enerjisi süt ile vücuttan atılan enerjiyi karşılayamamakta ve hayvanlar negatif enerji dengesi altına girmektedir. Bu durum ciddi oranda vücut depo yağının mobilizasyonuna ve karaciğere ulaşmasına sebep olur. Dolayısıyla karaciğerde başta yağ asidi metabolizması olmak üzere enerji üretim ve dönüştürme sistemleri ciddi oranda zarar görür ya da yavaşlar. Böyle bir tablo ketosis ve yağlı karaciğer gibi metabolik hastalıkların gelişmesine zemin hazırlar. Bu hastalıklarda damızlık süt sığırı çiftliklerinde en önemli sürü dışı bırakma sebepleri arasında yer almaktadır (Steenefeld ve ark. 2020). Dolayısıyla hayatının ilk laktasyon döneminde ketosis geçiren bir düve henüz laktasyon dönemi bitmeden yetersiz süt ve döl verimi gibi nedenlerle sürü dışı edilebilir. Bu tip sorunların üstesinden gelmek için doğum sonrası rasyonların sindirilebilir enerji ve esansiyel aminoasit içeriklerinin artırılması birçok araştırmacı tarafından zaman zaman ele alınmıştır (Chillard 1993, Chow ve ark. 1990, Erickson ve ark. 1992, Harrison ve ark. 1995, Rulquin ve ark. 1993, Schingoethe 1991, Schwab ve ark. 1992a, Schwab ve ark. 1992b).

Bu dönemde metabolik olarak en çok zorlanan ve en fazla metabolik hastalığın görüldüğü sistem enerji sistemidir. Enerji sisteminin takibi açısından en çok kullanılan parametreler ise kanda NEFA, BHBA, glukoz, TK ve Trig seviyeleridir (Drackley 1991,

Duffield 2000, Overton ve ark. 1991, Overton ve Waldron 2004).

Başta metil vericiler olmak üzere esansiyel aminoasitler bu dönemde karaciğere ulaşan yağların uzaklaştırılmasında etkin rol aldıkları için özellikle süt ineklerinde kuru dönem ve erken laktasyon dönemi rasyonlarında ek olarak kullanılmaktadır (Griel ve ark. 1968, Schwab 1976, Loerch ve Oke 2018). Bilinen en etkili metil vericisi aminoasit metiyonindir. Dolayısıyla doğum öncesi metiyonin takviyesi yapılan sığırlarda doğum sonrası metabolik problemler hafiflemektedir. Bunu destekler nitelikte bir başka çalışmada da (Van Saun R 1991) doğum öncesi rasyonların ham protein (HP) ve rumende yıkılmayan protein düzeyleri arttırıldığında doğum sonrası metabolik hastalık görülme düzeyinin azaldığı belirtilmiştir. Bununla birlikte rasyonu gerek süt verimini sınırlandırıcı gerek büyüme ve gelişmeyi sınırlandırıcı gerekse karaciğer metabolizmasını destekleyen en önemli aminoasitler olan metiyonin ve lizince desteklenmesi HP düzeyinin sağlıklı bir şekilde düşürülmesine yardımcı olur (Hristov ve Giallongo 2014).

Yem hammaddeleri içerisinde lizin ve metiyonin doğal kaynakları mısır ve soyaya bağlı kaynaklardır (Armentano ve ark. 1997). Ülkemizde ise bu hammaddelerin üretimi çok sınırlı olup aynı zamanda yüksek oranda insan ve kanatlı beslenmesinde kullanıldıkları için maliyetleri çok yüksektir. Bunlar yerine ülkemizde üretimi daha yaygın ve ruminantlar için birim maliyetleri daha düşük olan konsantre enerji ve protein kaynakları sırasıyla arpa, pamuk tohumu küspesi, ayçiçeği küspesidir. Ancak bu hammaddelerinde metiyonin ve lizin içerikleri oldukça düşüktür (Rulquin ve Delaby 1997). Dolayısıyla rasyonun hem insan ve kanatlılarla yarışmacı olan hem de birim maliyeti yüksek olan soya ve yan ürünleri ile zenginleştirilmesi yerine bu aminoasitlerin rasyona ek olarak katılması hem protein düzeyinin düşürülmesine hem de rasyon maliyetinin azaltılmasına yardımcı olabilir.

İkame düvelerin doğum anındaki canlı ağırlıkları yukarıda bahsedilen negatif enerji dengesi ve metabolik adaptasyonlar için de önem taşır. Çünkü bahsi geçen negatif enerji dengesi nedeniyle doğum sonrası bir miktar canlı ağırlık kaybı normal karşılanmaktadır. Buna göre NRC (2001)'de doğum sonrası süt ineklerinin tüketmesi önerilen rasyon formülasyonlarında dahi yaklaşık günde 1 kg canlı ağırlık kaybı öngörülmektedir. Sonuç olarak doğum yaptığında hedef canlı ağırlığa ulaşmamış olan düvelerde bu canlı ağırlık kaybı metabolik açıdan beklenenin üzerinde zarar verebilir.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışma Çanakkale'nin Gökçalı köyünde faaliyet gösteren Kaanlar Damızlık Süt Sığırtı İşletmesinde yürütülmüştür. Çalışmanın hayvan materyalini gebeliğinin 210. gününde bulunan Holştayn ırkı düveler oluşturmuştur. Bu bağlamda 30 baş sağlıklı ve geçmişinde önemli bir sağlık problemi kaydı bulunmayan gebe düve rastgele örnekleme metoduyla aynı sayıda hayvan içeren iki gruba ayrılmıştır. Kontrol (K) grubunda bulunan hayvanlar NRC (2001)'de belirtilen enerji ve protein içeriğine sahip rasyonla beslenmiştir. Uygulama grubundaki (U) hayvanlar K grubuyla aynı düzeyde enerji ve protein içeren ancak lizin ve metiyonin düzeyleri sırasıyla 7.18 (%MP) ve 2.72 (%MP) olacak şekilde rumen korumalı lizin (lysigem, Kemin) ve metiyonin (Methipearl, Kemin) takviyesi yapılmış rasyonla beslenmiştir. Her iki gruptaki hayvanlar aynı ahırda fakat ayrı padoklarda barındırılmıştır. Rasyonlar günde bir defa hazırlanarak Tam Rasyon (TMR) şeklinde hazırlanarak *ad libitum* olarak hayvanlara sunulmuştur. *Ad libitum* koşulların sağlanması amacıyla TMR gruptaki hayvan sayısının %10 fazlası olacak şekilde hazırlanarak hayvanların önündeki yemliklere dökülmüştür. Yeni günün rasyonu hayvanların önüne dökülmeden önce grupların önündeki artan yemler toplanarak ayrı ayrı tartılmış ve grupların yem tüketimleri bu şekilde günlük olarak takip edilmiştir.

Çalışmanın başında, çalışma boyunca hayvanların beslenmesinde kullanılacak olan tüm hammaddelerden örnek alınarak besin madde analizler gerçekleştirilmiştir. Buna göre kuru madde (KM), HP, ham yağ (HY) ve kül analizleri AOAC (1990)'ın bildirimleri doğrultusunda yapılmıştır. Buna ilaveten hücre duvarı bileşenlerinin (NDF, ADF ve ADL) belirlenmesine yönelik analizler Van Soest ve ark. (1991)'in bildirimleri doğrultusunda yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar CNCPS veri tabanlı rasyon programına işlenmiş tüm formülasyonlar analiz

değerlerine göre yapılmıştır. Ayrıca artan yemlerden alınan örneklerde dondurularak çalışma sonunda yukarıda adı geçen besin madde analizlerine tabi tutulmuştur. Çalışmada uygulanan örnek TMR'ın hammadde bileşimi ve grupların tüketilecekleri besin madde kompozisyonları Tablo 1, Tablo 2 ve Tablo 3'de ayrıntıları ile belirtilmiştir.

Çalışma boyunca 15'er gün aralıklarla tüm hayvanların kuyruk venasından (V. coccygea) kuru biyokimya tüplerine kan örneği alınmıştır. Alınan kanlar işletmede bulunan laboratuvarındaki santrifüj aleti aracılığıyla oda ısısında 5000 devirde 10 dakika boyunca santrifüje edilerek serum örnekleri çıkarılmıştır. Elde edilen örnekler hemen -20 derecede dondurulmuştur. Hayvanlar üzerindeki deneme aşaması sonlandığında oda ısısında çözdüren serum örneklerine işletmede bulunan tam otomatik ELISA okuyucu yardımı ve ilgili kitler kullanılarak glukoz, NEFA, BHBA, TK, Trig ve IgG analizleri yapılmıştır. Ayrıca enfeksiyon kapma riski en yüksek olan doğumun gerçekleştiği gün tüm hayvanlardan vakumlu ve EDTA'lı tüplere yine kuyruk venasından alınan kan örneklerine işletmede bulunan Genus KT-6300 VET marka-model cihaz yardımıyla hemogram analizi yapılarak mevcut bağışıklık durumu ve özellikle total lökosit sayısı ile lökosit konfigürasyonu (yüzdesel bazda nötrofil, monosit, eozinofil ve bazofil düzeyi) belirlenmiştir.

Serum glukoz, NEFA, BHBA, trigliserid, total kolesterol ve IgG düzeylerine ilişkin analizlerde grup, dönem ve grup x dönem etkileşimlerinin ana etki kaynağı olarak yer aldığı tekrarlamalı ölçümler varyans analizi kullanılmış olup, NEFA ve trigliserit düzeylerine ait veriler üzerinde gerçekleştirilen homojenite testi bulguları doğrultusunda veriler logaritmik transformasyona tabi tutulmuşlardır. Grup ortalamaları arasındaki farklılıkların tespitinde Tukey çoklu karşılaştırma testinden yararlanılmıştır. Tüm istatistik analizlerde SAS version 9 (1999) paket programından yararlanılmıştır.

Tablo.1 Çalışmada kullanılan TMR bileşimi
Table.1 Feedstuff content of TMR

Hammaddeler	% Kuru Madde
Mısır Silajı	40.39
Yonca Kuru Otu	9.76
Buğday Samanı	15.36
Konsantre Yem Karması	34.49

Tablo.2 Çalışmada kullanılan TMR besin madde kompozisyonu
Table.2 Nutrient Composition of TMR

Hammaddeler	Kontrol	Uygulama
Ham Protein	15.08	15.07
Metabolik Enerji (Mcal/Gün)	16.01	16.08
NDF	42.28	42.26
ADF	26.19	26.05
NSC	31.53	31.69
Kalsiyum	0.58	0.58
Fosfor	0.51	0.51
Lizin %MP	5.16	7.18
Metiyonin %MP	2.24	2.72

Tablo.3 Konsantre yem karması bileşimi ve besin madde kompozisyonu
Table.3 Feedstuff content and nutrient composition of the Grain Mix

Hammaddeler (%)	Kontrol	Uygulama
Buğday Kepeği (İnce öğ.)	11.7	11.7
Mısır, Öğütülmüş	11.8	11.8
DDGS, (Mısır)	51.5	51.5
Maya Artıkları	23.4	21.7
Mermer Tozu	0.7	0.7
Vitamin-Mineral Karması	0.9	0.9
LysiGEM (KEMIN IND.)	0.0	1.4
Metipearl (KEMIN IND.)	0.0	0.3

Besin Madde Kompozisyonu (%)	Kontrol	Uygulama
Ham Protein	26.35	26.31
Metabolik Enerji (Mcal/kg)	1.82	1.82
Ham Selüloz	6.34	6.28
Nişasta	12.55	12.55
NFC	28.24	28.05
Kalsiyum	0.76	0.76
Fosfor	1.01	1.01

Tablo.4 Gruplarda farklı dönemlerde ölçülen serum parametrelerine ait en küçük kareler ortalamaları (EKKO), ortalamalara ilişkin standart hatalar (SH) ve önem seviyeleri (P)

Table.4 The least square means of serum paramters which measured in different periods, standart errors and significance

Dönem	Özellik	Kontrol	Uygulama
-3	Glukoz	52.46	53.51
-2		55.51	56.78
-1		58.12	60.79
0		56.85	54.78
+1		48.78	51.12
+2		53.17	54.92
		SH	1.312
	P	0.5241	
-3	NEFA*	0.628	0.586
-2		0.548	0.539
-1		0.525	0.519
0		0.594	0.581
+1		0.586	0.599
+2		0.619	0.610
		SH	0.011
	P	0.1822	
-3	BHBA	1.19	0.99
-2		0.62	0.51
-1		0.33	0.35
0		0.81	0.60
+1		0.96	0.99
+2		1.28	1.09
		SH	0.082
	P	0.3635	
-3	TK	91.65	95.66
-2		87.51	93.58
-1		95.39	88.65
0		74.37	74.79
+1		77.33	74.38
+2		75.52	72.52
		SH	2.895
	P	0.3065	
-3	Trig	1.33	1.32
-2		1.30	1.34
-1		1.37	1.28
0		1.08	1.09
+1		1.11	1.11
+2		1.07	1.08
		SH	0.030
	P	0.4146	
-3	IGG	14.44	16.83
-2		14.39	16.53
-1		16.58	16.24
0		13.57	15.31
+1		13.11	14.39
+2		12.92	14.11
		SH	0.507
	P	0.0536	

*Değerleri transforme değerlerdir, “-“doğum öncesi, “+” doğum sonrası, “0” ise doğumu simgelemektedir.

*These are transformed values, “-“represents before parturition, “+” represents after parturition and “0” represents day of parturition.

BULGULAR

Yapılan bu çalışmada elde edilen kan analizlerinin istatistiki verilerine göre çalışma boyunca gerek gruplar arası gerekse grup içi farklar Tablo 4'te ayrıntılarıyla belirtilmiştir. Buna göre tabloda görüleceği gibi Holştayn ırkı sütçü düvelerde doğum öncesi rasyonunda metabolik lizin ve metiyonin seviyesinin arttırılmasının kanda glukoz, NEFA, BHBA, TK, Trig ve IgG konsantrasyonları üzerine herhangi bir etkisi olmamıştır. Yapılan bu çalışmada enerji metabolizmasının en önemli göstergeleri olan glukoz, NEFA, BHBA, TK ve Trig seviyelerinin doğum öncesi ve doğum sonrasındaki seyri üzerine elde edilen bulgularda önemlidir. Bu konu üzerine yapılan çalışmaların çoğunluğunda belirtildiği üzere doğum öncesi son haftalarda negatif enerji dengesinin etkileri neticesinde bu parametrelerde önemli değişiklikler olmaktadır. Ancak yapılan bu çalışmada bahsi geçen parametrelerin gerek gebeliğin son üç haftası gerekse doğum ve doğum sonrası ilk iki gün süresince önemli bir değişiklik göstermedikleri belirlenmiştir. Bu bilgilere istinaden yapılan bu çalışmada gerek kontrol gerekse uygulama grubundaki hayvanların şiddetli bir negatif enerji dengesi altına girmedikleri söylenebilir. Bununla birlikte çalışma süresince bazı haftalarda elde edilen bazı bulgular ise oldukça kıymetlidir. Örneğin kanda BHBA seviyesinin kontrol grubundaki düvelerde doğumdan önceki son hafta subklinik ketozis seviyesi olan 1.2 mmol/l sınırına dayanması, yine aynı grupta doğumun ikinci gününde ise 1.28 mmol/l çıkması belirtilen zamanlarda ketozis insidansı açısından oldukça riskli bir sürecin yaşanmış olduğunu göstermektedir. Ayrıca yine kontrol grubunda kan glukoz seviyesinin doğumdan bir gün sonra 50 mg/dl olan kritik seviyenin altına düşmesi, doğum öncesi yüksek olan TK seviyesinin doğumda aniden düşerek doğum sonrasında düşük seyretmesi gibi veriler subklinik ketozis için belirtilen günlerin kritik oluşunu desteklemektedir. Fakat uygulama grubunda doğuma bir hafta kala yükselen BHBA düzeyi doğum sonrasında da yüksek seyretmiş olsa da hiçbir zaman subklinik ketozis sınırı olan 1.2 mg/dl'yi geçmemiştir. Ayrıca yine uygulama grubunda doğumla birlikte kolesterol seviyesi düşmüş olsa da kan glukoz düzeyi hiçbir ölçümde 50 mg/dl'nin altına düşmemiştir. Bahsi geçen bu üç parametre açısından gruplar arasında istatistiki fark bulunmamış olsa da elde edilen veriler oldukça şaşırtıcıdır. Grup içerisindeki hayvan sayısı arttırılarak yapılacak olan benzer çalışmalarda istatistiki veri gücü artarak bu parametrelerde ve belirtilen günlerde önemli farklar ortaya çıkabilir. Glukoz, BHBA ve TK seviyelerinde bu şekilde bir seyir görülmesinin en önemli sebebinin doğum sonrasındaki kolostrum sentezi ve salgısı olduğu düşünülmektedir.

Metabolik parametrelerin dışında çalışmadaki yegâne bağışıklık parametresi olan kanda IgG seviyesinin gruplardaki seyri de ilgi çekicidir. İstatistiki olarak fark olmaması ile birlikte uygulama grubunda sayısal olarak kan IgG seviyesinin yüksek olduğu görülmektedir. Grafik 1'de çalışma başında alınan örnekler haricindeki tüm kan alım zamanlarında uygulama grubu IgG açısından rakamsal olarak yüksektir. Eldeki bu veriler gerek kan alım zamanının sıklaştırılmasıyla gerekse gruplar içerisindeki hayvan sayılarının artırılmasıyla IgG'deki bu değişimin istatistiki olarak önemli hale getirip getirilmeyeceğini merak ettirmektedir. Bilhassa Tablo 4'te görüleceği üzere kontrol grubunda doğum öncesinde düşmeye başlayan IgG seviyesi doğum sonrasında bu düşüşü devam ettirmiştir. Ancak uygulama grubunda ise doğum öncesinde IgG seviyesi kontrol grubunun aksine az miktarda olsa yükselmiş, doğum sonrasında ağız sütü sağımını takiben beklenildiği gibi düşüş göstermiş olmakla birlikte yine rakamsal olarak kontrol grubunun üzerinde seyretmiştir. Bu bulgular Holştayn ırkı sütçü düvelerin doğum öncesinde lizin ve metiyonince zenginleştirilmiş bir rasyonla beslenmesinin doğum sonrasında hem anne hem de yavru bağışıklığını destekleyeceği olasılığını ortaya koymaktadır.

TARTIŞMA

Süt sığırları doğumla birlikte çok şiddetli bir metabolik adaptasyon süreci içerisine girerler (Overton ve Waldron 2004). Aynı zamanda bu süreç ciddi düzeyde rasyon değişikliklerini olduğu bir süreçtir. Doğumla birlikte artan besin madde ihtiyacı ve rasyon değişimi nedeniyle rumen fermantasyonun adaptasyon sürecine bağlı olarak yaşanan zorunluluklar hayvanları metabolik hastalıklara karşı oldukça duyarlı hale getirmektedir. Bu süreç ilk doğumunu yapacak olan gebe düveler için çok daha stresli ve yorucu olmaktadır. Doğum yapana dek hayatları boyunca en fazla yaklaşık 11 kg KM tüketen düveler doğumdan hemen sonra yaklaşık 17 kg KM içeren bir rasyonu tüketmeye zorlanmaktadırlar (NRC 2001). İlk doğumunu yapan düveler iki ve daha fazla doğum yapmış ineklere göre doğum sonrasında yem tüketimi pikine daha geç ulaşmaktadırlar. Bu durum onların metabolik adaptasyon kabiliyetlerini zayıflatmaktadır. Böylelikle başta enerji ve bağışıklık sistemini ilgilendiren hastalıklara karşı daha dayanıksız olurlar. Negatif enerji dengesinin başlamasında beslenme hastalıklarının gelişmesine kadar geçen süreçte hayvanlarda hiçbir semptom görülmez ve bu süreç çok sinsi bir şekilde ilerler. Bu süreç içerisinde hayvanlarda beslenme hastalıklarına yatkınlığın düzeyini belirlemede kandaki metabolik parametrelerin takibi büyük önem taşır. Bu süreçte takip edilmesi gereken en önemli metabolik parametreler ise NEFA, BHBA, glukoz, TK, Trig'tir (Overton ve Waldron 2004). Çünkü NEFA ve BHBA

bu dönemde gelişen negatif enerji dengesinin en önemli indikatörleri olup hayvanların subklinik ketozis ve karaciğer yağlanması risklerine yakınlığını net bir şekilde ortaya koyarlar (McArt ve ark. 2013). Son yıllarda bu iki parametrenin aynı zamanda bağışıklık düzeyi üzerine etkileri olduğunu bildiren çalışmalarda mevcuttur (Contreras ve ark. 2010, Ster ve ark. 2012). NEFA adipoz dokudan yağ moleküllerinin kana geçiş formu olup kanda yüksekliği aşırı yağ yakımını gösterir. Karaciğere ulaşan NEFA miktarı arttığında fazla olan NEFA'ların bir kısmı bir keton molekülü olan BHBA, aseton ve asetoasetat'a dönüştürülürken (Herdt 2000), bir kısmı TK ve Trig dönüştürülerek kana tekrar verilir (Jorristma ve ark. 2001), bir kısmı da hepatositlerde birikir (Overton ve Waldron 2004). Dolayısıyla NEFA'nın karaciğerde en güvenli uzaklaştırılma yolu trigliserit ve kolestrole dönüştürülmesidir. Aksi halde ketozis ve karaciğer yağlanmasının hızla gelişmesi kaçınılmaz olur. Buna göre süt sığırlarında doğumundan hemen önce ve sonra gelişen negatif enerji dengesine bağlı olarak kanda NEFA düzeyi artarsa hayvanın bundan minimum düzeyde etkilenmesi için kan BHBA düzeyinin düşük, Trig ve TK seviyelerinin yüksek olması gerekir (McArt 2013). Tüm bu parametrelerin yanında negatif enerji dengesini ve sonrasında gelişen subklinik ketozis durumunda kan glukoz seviyesi de oldukça önemli bir kriterdir. Çünkü kanda glukoz seviyesiyle karaciğer yağlanması ve ketozis arasında sıkı bir ilişki vardır (McArt 2013, Ruoff ve ark. 2017). Buna göre süt sığırlarında doğumdan hemen önceki ve sonraki dönemde metabolik parametrelerin sağlıklı devam edebilmesi adına kanda NEFA ve BHBA seviyesinin düşük, glukoz seviyesinin ise yüksek olması istenir. Bu parametreler için kritik seviyelerden bahsetmek gerekirse; kanda BHBA seviyesi 1.2 mmol/l'nin üzerinde (Andersson 1988, Suthar ve ark., 2013; Mc Art, 2013), kanda glukoz seviyesi ise 50 mg/l (2,7mmol/l)'nin altında olmamalıdır (Ruoff ve ark. 2017). Yapılan bu çalışmada ileri gebe sütçü düvelerin gebeliklerinin son üç haftasında rasyonun metabolik lizin ve metiyonin düzeyinin artırılmasının kanda NEFA, BHBA, glukoz, TK, Trig seviyeleri üzerine istatistiki açıdan önemli bir etkisi bulunmamıştır. Fakat bazı parametrelerde çalışmanın bazı dönemlerinde elde edilen veriler oldukça düşündürücüdür. Örneğin kontrol grubunda doğuma bir hafta kala ve doğum sonrası ikinci gün kanda BHBA seviyesinin subklinik ketozis için kritik seviye olarak kabul edilen 1.2 mmol/l'ye (Andersson 1988, Suthar ve ark. 2013, Mc Art, 2013) yakın ya da üzerinde iken, uygulama grubunda aynı dönemlerde yükselme görülse de subklinik ketozis seviyesine hiçbir zaman yükselmemiş oluşu çalışma adına önemli bir bulgudur. Ayrıca yine enerji metabolizması açısından kritik bir eşik olan kan glukoz seviyesinin 50 mg/l (2.7mmol/l)'nin (Ruoff ve ark, 2017) altına sadece kontrol grubunun birinci gün kanında indiği görülmektedir. Fakat her iki grupta da başta NEFA

olmak üzere diğer parametrelerin fizyolojik sınırlar içerisinde seyretmesi ve her iki grupta da herhangi klinik düzeyde bir metabolik hastalık görülmemesi bu çalışma da düvelerin çok şiddetli bir negatif enerji dengesi etkisi altında olmadıklarını göstermektedir. Dolayısıyla rasyonlarında artırılan metabolik lizin ve metiyonin düzeylerinin enerji metabolizmasına beklenen etkiyi göstermemesi doğal bir sonuçtur. Ancak çalışma uzatılarak bu hayvanlara ait ilk laktasyon verileri de izlenebilseydi özellikle kontrol grubunda doğumun hemen öncesi ve sonrasında subklinik ketozis seviyesinde olan kan BHBA düzeyi ile kan glukoz düzeyinin performansa etkisi daha net bir şekilde görülebilirdi. Eldeki veriler ve hayvanların beklenenin aksine şiddetli bir metabolik adaptasyon sürecine girmemiş olmaları bu çalışmada yapılan uygulamanın enerji metabolizması üzerine etkisini yorumlamayı zorlaştırmaktadır. Ayrıca doğum öncesi ve sonrasında tüm düveler NRC, 2001 'de belirtilen standartlara göre beslenmiştir. Yapılan bu çalışma NRC (2001)'e göre hazırlanan rasyonların Holstaysn ırkı sütçü düvelerde doğumdan hemen önce ve sonrasında kandaki enerji metabolizma parametrelerinin sağlıklı devam edebilmesi adına yeterli olduğunu göstermektedir.

Yapılan bu çalışmada takip edilen diğer parametre de kanda IgG seviyesidir. Kanda IgG seviyesinin takibi hayvanlarda bağışıklığın durumunu ortaya koymak adına oldukça önemlidir. Bu çalışmada gruplar arasında istatistiki bir fark bulunmamış olsa da gerek doğum öncesi gerekse doğum sonrası serum IgG düzeyi uygulama grubunda rakamsal olarak yüksek seyretmiştir. Wang ve ark. (2021)'da yaptıkları bir çalışmada süt sığırlarına doğum öncesinde ekstra lizin ve metiyonin verilmesinin hem anne kanında hem de kolostrumda ve buzağı kanında serum IgG seviyesini artırdığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar protein metabolizması açısından esansiyel olan bu iki amino asitin globülin sentezini artırdığını, antikor üretimine etkisi olduğunu ve bağışıklığı güçlendirdiğini belirtmişlerdir. Fakat doğum öncesi rasyona rumen korumalı metiyonin ilavesinin besi sığırlarında (Lievre ve ark. 2020) ya da koyunlarda (Liu ve ark. 2016) doğum döneminde kanda IgG seviyesini değiştirmediği, hatta azalttığını dahi bildiren benzer çalışmalar da bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalar incelendiğinde, araştırmacıların rasyonun metabolik proteinindeki metiyonin ve lizin seviyelerini zenginleştirmeye odaklanmadıkları, sadece rasyona ek olarak belli bir dozda metiyonin kullandıkları görülmektedir. Dolayısıyla, belirtilen etkilerin yetersiz metiyonin dozu ile ilişkisi olabilir. Daha önce de belirtildiği üzere, mevcut çalışmada NRC (2001) tavsiye rasyonu baz alınmıştır.

SONUÇ

Bu çalışmada Holştayn ırkı sütçü gebe düvelerde, gebeliğin son aylarında lizin ve metiyonin içeriği rumen korumalı lizin ve metiyonin eklenerek zenginleştirilmiş bir rasyon uygulamasının kanda enerji ile ilgili metabolizma parametreleri ve IgG seviyesi üzerine istatistiki açıdan önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Ancak belli bazı haftalarda BHBA ve glukozda görülen farklılıklar ile IgG seviyesinde görülen rakamsal artışın daha net veriler eşliğinde ortaya konulabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca NRC (2001)'in sütçü düvelerde doğum öncesi ve sonrasını kapsayan süreçte enerji metabolizmasının sağlıklı bir şekilde devam edebilmesinde yeterli bir referans kaynak olduğu görülmüştür.

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

Yazarların Katkı Oranı: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan etmişlerdir.

Etik izin: Bu çalışma ÇOMU HADYEK 2021/03-07 numara ve 06.04.2021 tarih ile izin almıştır.

Finansal destek: Bu çalışmada herhangi bir kurumdan finansal destek alınmamıştır.

Teşekkür: Bu çalışmada desteklerini veren Sn. Suat Sarıbrahimoğlu ve Kaanlar Tarım ve Hayvancılık İşletmesi'ne teşekkürlerimizi sunarız.

Açıklama: Bu veriler henüz herhangi bir yerde sunulmamıştır.

KAYNAKLAR

- Andersson L.** Subclinical ketosis in dairy cows. *Veterinary clinics of north america: Food animal practice*, 1988. 4(2), 233-251.
- AOAC.** *Official methods of analysis*. 14th edition. Association of Official Analytical Chemists. 1990. Washington, DC.
- Armentano, LE, Bertics, SJ, Ducharme GA.** Response of lactating cows to methionine or methionine plus lysine added to high protein diets based on alfalfa and heated soybeans. *Journal of Dairy Science*, 1997. 80(6), 1194-1199.
- Cady RA, Smith TR.** Economics of heifer raising programs. Proc. Calves, Heifers, and Dairy Profitability National Conference. North Regional Agricultural Engineering Service Pub. No. 74 pp 7- 24. 1996. Cornell University, Ithaca, New York, USA.
- Chilliard Y, Doreau M, Gagliostro G, Elmeddah Y.** Addition de lipides protégés (encapsulés ou savons de calcium) à la ration de vaches laitières. Effets sur les performances et la composition du lait. *INRA Productions Animales*. 1993. 6(2), 139-150.

- Chow, JM, DePeters EJ, Baldwin RL.** Effect of rumen-protected methionine and lysine on casein in milk when diets high in fat or concentrate are fed. *Journal of Dairy Science*, 1990. 73.4:1051-1061.
- Contreras GA, O'boyle NJ, Herdt TH, Sordillo LM.** Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 2010. 93(6), 2508-2516.
- Drackley JK.** ADSA foundation scholar award: Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J. Dairy Sci.* 1999. 82, 2259–2273. [https://doi.org/10.3168/jds.s00220302\(99\)75474-3](https://doi.org/10.3168/jds.s00220302(99)75474-3).
- Duffield T.** Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Veterinary clinics of north america: Food animal practice*, 2000. 16(2), 231-253.
- Erickson PS, Murphy MR, Clark JH.** Supplementation of dairy cow diets with calcium salts of long-chain fatty acids and nicotinic acid in early lactation. *Journal of Dairy Science*. 1992. 75(4), 1078-1089.
- Griel Jr LC, Patton RA, McCarthy RD, Chandler PT.** Milk production response to feeding methionine hydroxy analog to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 1968, 51(11), 1866-1868.
- Grummer RR.** Close-up dry period: feeding management for a smooth transition. *Proceedings 1996. WCDS, Red Deer, Alberta*.
- Harrison JH, Kincaid RL, McNamara JP, Waltner S, Loney KA, Riley RE, Cronrath JD.** Effect of whole cottonseeds and calcium salts of long-chain fatty acids on performance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 1995. 78(1), 181-193.
- Herdt TH.** Ruminant adaptation to negative energy balance: Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2000. 16(2), 215-230.
- Hristov AN, Giallongo F.** Feeding protein to dairy cows-what should be our target?. In Proceedings of the 23rd Tri-State Dairy Nutrition Conference, Fort Wayne, Indiana, USA. 2014. 14-16 April 2014 (pp. 75-84). Ohio State University.
- Jorritsma R, Jorritsma H, Schukken YH, Bartlett PC, Wensing TH, Wentink GH.** Prevalence and indicators of post partum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in The Netherlands. *Livestock Production Science*, 2001. 68(1), 53-60.
- Lievre M.** Effects of Metabolizable Protein and Supplemental Methionine in Late Gestation on Colostrum Quality and Transfer of Passive Immunity in Beef Cattle. 2020. (Doctoral dissertation, University of Guelph).
- Liu S, Lei J, Hancock S, Scanlan V, Broomfield S, Currie A, Thompson A.** Lamb survival, glutathione redox state and immune function of neonates and lambs from periparturient Merino ewes supplemented with rumen-

- protected methionine. *Archives of animal nutrition*, 2016. 70(5), 389-401.
- Loerch SC, Oke BO.** Rumen protected amino acids in ruminant nutrition. In *Absorption and utilization of amino acids*, 2018. (pp. 187-200). CRC Press.
- McArt JA, Nydam DV, Oetzel GR, Overton TR, Ospina PA.** Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *The Veterinary Journal*, 2013. 198(3), 560-570.
- National Research Council.** Nutrient requirements of dairy cattle), National Academy Press, Washington, DC (2001).
- Overton TR, Drackley JK, Ottemann-Abbamonte CJ, Beaulieu AD, Emmert, LS, Clark, JH.** Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. *J. Anim. Sci.* 1999. 77, 1940-1951. <https://doi.org/10.2527/1999.7771940x>.
- Overton, TR, Waldron, MR.** Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *Journal of dairy science*. 2004. 87, E105-E119.
- Ruoff J, Borchardt S, Heuwieser W.** Associations between blood glucose concentration, onset of hyperketonemia, and milk production in early lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2017. 100(7), 5462-5467.
- Rulquin H, Pisulewski PM, Vérité R, Guinard J.** Milk production and composition as a function of postruminal lysine and methionine supply: a nutrient-response approach. *Livestock Production Science*, 1993. 37(1-2), 69-90.
- Schingoethe DJ.** Byproduct feeds: feed analysis and interpretation. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 1991. 7(2), 577-584.
- Schwab CG, Satter LD, Clay AB.** Response of lactating dairy cows to abomasal infusion of amino acids. *Journal of Dairy Science*, 1976. 59(7), 1254-1270.
- Schwab CG, Bozak CK, Whitehouse NL, Mesbah MMA.** Amino acid limitation and flow to duodenum at four stages of lactation. 1. Sequence of lysine and methionine limitation. *Journal of Dairy Science*, 1992a. 75(12), 3486-3502.
- Schwab CG, Bozak CK, Whitehouse NL, Olson VM.** Amino acid limitation and flow to the duodenum at four stages of lactation. 2. Extent of lysine limitation. *Journal of Dairy Science*. 1992b. 75(12), 3503-3518.
- Steenefeld W, Amuta P, Van Soest FJ, Jorritsma R, Hogeveen H.** Estimating the combined costs of clinical and subclinical ketosis in dairy cows. *PLoS one*. 2020. 15(4), e0230448.
- Ster C, Loiselle MC, Lacasse P.** Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *Journal of Dairy Science*, 2012. 95(2), 708-717.
- Suthar VS, Canelas-Raposo J, Deniz A, Heuwieser W.** Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2013. 96(5), 2925-2938.
- Van Saun RJ.** Dry cow nutrition: the key to improving fresh cow performance. *Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice*, 1991. 7(2), 599-620.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA.** Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 1991. 74.10: 3583-3597.
- Wang H, Elsaadaw SA, Wu ZH, Bu D.** Maternal supply of ruminally-protected lysine and methionine during close-up period enhances immunity and growth rate of neonatal calves. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021. 1456.

The Effects of In Ovo Administered Monosodium Glutamate on the Embryonic Development of Skeletal Muscle in Chickens

Ferhan BÖLÜKBAŞ^{1*}

¹Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine Aksaray University, 68100, Aksaray, Türkiye

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of monosodium glutamate (MSG) in ovo administration on embryonic skeletal muscle development in chicken embryos, using histological, histopathological, and immunohistochemical methods. In this study, a total of 410 fertilized chicken eggs were used and were divided into five groups as control, vehicle control, low-dose group (0.12 mg/g egg MSG), medium-dose group (0.6 mg/g egg MSG), and high-dose group (1.2 mg/g egg MSG). At incubation days 18 and 21, eggs from each group were opened and six live embryos were obtained. The embryos were sacrificed by decapitation, and skeletal muscle tissue samples (musculus fibularis longus and musculus sternocoracoideus pectoralis) were obtained. Sections were stained with hematoxylin-eosin. Moreover, caspase-3 reactivity was determined using the immunohistochemical method. Muscle development was delayed in the MSG groups and the number of caspase-3-positive cells was higher ($p < 0.05$) than in the controls. Histopathological examinations revealed degenerative and necrotic changes in the skeletal muscle. Muscle degeneration (edema, muscle fiber degeneration, Zenker's necrosis, and mononuclear cell infiltrations) were observed in all groups, except for the control groups. It was concluded that MSG could adversely affect the development of the skeletal muscle.

Keywords: Caspase-3, Embryotoxicity, Monosodium glutamate, Skeletal muscle

Yumurtaya Verilen Monosodyum Glutamat'ın Tavuklarda İskelet Kasının Embriyonik Gelişimi Üzerine Etkileri

ÖZ

Bu çalışmanın amacı yumurtaya verilen monosodyum glutamat (MSG)'in civcivlerde iskelet kasının embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin histolojik, histopatolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırmaktır. Bu çalışmada 410 adet dömlü tavuk yumurtası kullanıldı ve kontrol, taşıyıcı kontrol, düşük doz grup (0.12 mg/g MSG), orta doz grup (0.6 mg/g MSG) ve yüksek doz grup (1.2 mg/g MSG) olarak 5 gruba ayrıldı. Kuluçkanın 18 ve 21. günlerinde, her bir gruptan yumurtalar açıldı ve 6 canlı embriyo elde edildi. Embriyolar dekapitasyon ile sakrifiye edildi ve iskelet kası (musculus sternocoracoideus pectoralis, musculus fibularis longus) doku örnekleri alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi ile boyandı. Caspase-3 reaktivitesi ise immunohistokimyasal yöntemle belirlendi. Kas gelişiminin MSG uygulanan gruplarda geri kaldığı ve caspase-3 immunpozitif hücrelerin kontrol grupları ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu dikkati çekti ($p < 0.05$). Histopatolojik incelemelerde iskelet kasında dejeneratif ve nekrotik değişiklikler saptandı. Kontrol ve distile su grubu hariç tüm gruplarda kaslarda dejenerasyon (ödem, kas fibrillerinde dejenerasyon, Zenker nekrozu ve mononükleer hücre infiltrasyonu) gözlemlendi. MSG'nin iskelet kası gelişimi üzerine olumsuz etkilerinin olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Embriyotoksisite, İskelet kası, Kaspaz-3, Monosodyum glutamate

To cite this article: Bölükbaş F. The Effects of Monosodium Glutamate on Skeletal Muscle Development in Chicken Embryos. Kocatepe Vet J. (2023) 16(2):47-56

Submission: 25.12.2022 Accepted: 24.02.2023 Published Online: 03.03.2023

ORCID ID; FB: 0000-0002-9744-0242

*Corresponding author e-mail: ferhan.bolukbas@aksaray.edu.tr

Food additives are substances used in the food industry to extend the shelf-life of foods, increasing their flavor, color, durability, and consumer acceptability (Chakraborty 2019). People are exposed to these chemicals in their daily food consumption (Adeyemo & Farinmade 2013). Monosodium glutamate (MSG, E621), a sodium derivative of L-glutamate, is one of the most widely used food additives as a flavor enhancer in processed and convenience foods worldwide due to its umami taste and flavor-enhancing properties (Hamza and Diab 2020). Many processed foods contain MSG (e.g., fast food, frozen food, instant soup, broth (bouillon), preserves, processed meats such as sausage and salami, salad dressing, flavored snacks, and potato chips) (Abdel Moneim et al. 2018).

MSG has been reported to cross the placental barrier in rats. Subcutaneous MSG injections to pregnant rats have been reported to cause neuronal cell death in the rats and their fetuses (Toth et al. 1987). Experimental studies have shown that exposure to MSG during the embryonic period, which is critical for the development of living things, can lead to serious consequences (Banerjee et al. 2021, Bölükbaş and Öznurlu 2021). Studies on experimental animals have shown that MSG is associated with negative side effects such as genotoxicity, neurotoxicity, diabetes, obesity, and hepatotoxicity (Banerjee et al. 2021). MSG has been reported to induce oxidative stress in different organs including the kidneys, liver, genitals, and thymus (Pavlović et al. 2007, Zanfrescu et al. 2019). In addition, MSG administration has been associated with biochemical and morphological changes in cardiac tissue and changes in heart rhythm (Baky et al. 2009, Kumar and Bhandari 2013, Kingsley et al. 2013, Liu et al. 2013).

Muscle development occurs in hypertrophy and hyperplasia phases: Hypertrophic phase is characterized by the formation of new myofibrils in the muscle fibers (Remignon et al. 1995, Velleman 2007). Hyperplasia is characterized by an increase in the number of myoblast cells during the embryonic period (Latshaw 1987, Moore et al. 2005). The hyperplasia phase is largely completed during the incubation period, and the number of muscle fibers remains constant thereafter (Öznurlu et al. 2022). Therefore, the factors affecting muscle formation in the embryonic period may also affect the developmental performance of the chick in the future.

The aim of this study was to investigate the possible effects of MSG injected into the yolk on skeletal muscle development in chickens, using histological, histopathological, and immunohistochemical methods.

Animal Procedures

This study was conducted with the approval (Date: 02.06.2022, Protocol number: 2022/59) of the Ethics Committee of Selcuk University Faculty of Veterinary Medicine Experimental Animals Production and Research Center. 410 fertile chicken eggs obtained from the commercial Babcock breed were used. MSG (Sigma-Aldrich, St. Louis) was weighed with a precision scale, centrifuged, and diluted by distilled water that had been sterilized in an autoclave. MSG doses for each group were determined according to the 50-55 g egg weight (0.12 mg/g MSG (6–6.6 mg/egg), 0.6 mg/g MSG (30–33 mg/egg), and 1.2 mg/g MSG (60–66 mg/egg)). The eggs were disinfected in a closed cabinet for 15 min before the injection procedure (21 g of potassium permanganate + 42 mL of formaldehyde/m³). The eggs were randomly selected and divided into five groups. While no treatment was applied to the eggs in the control group (n = 40), the vehicle control group (n = 62) received a volume of 100 µL of distilled water by injection. MSG (100 µL) was injected into the eggs in the experimental groups at doses of 0.12 mg/g (low-dose, n = 80), 0.6 mg/g (medium-dose, n = 90), and 1.2 mg/g (high-dose n = 138) per egg. The test solutions were injected into the yolk by sterile insulin injectors at the beginning of incubation. Then, the injection site was sealed with paraffin wax. Incubation processes were incubated by turning 180° once every 2 hours under optimal conditions (37.5 °C temperature and 65% relative humidity) in the incubator (Imza Technical Equipment).

Histological and Immunohistochemical Investigations

On the 21st and 18th days of incubation, eggs were randomly selected and opened until six viable embryos were obtained from each group. Pectoral muscle (musculus sternocoracoideus pectoralis) and leg muscle (musculus fibularis longus) tissues were taken and fixed in 10% neutral buffered formalin solution (pH 7.4) for 24 h. Tissue samples processed by routine histological methods were embedded in paraffin. The sections taken from the blocks (thickness = 6 µm) were examined using the hematoxylin and eosin (H & E) staining method to determine the general histological structure.

Tissue samples used for immunohistochemical procedures were stained by applying a procedure based on the streptavidin-biotin-peroxidase complex (SABC). Briefly, 6-µm-thick sections were placed on poly-L-lysine-coated slides and dried in an oven at 37 °C overnight.

RESULTS

The sections were deparaffinated in xylol, rehydrated in alcohol, and boiled in citrate buffer solution (pH 6) for 5 min in a microwave oven to reveal antigenic epitopes (antigen retrieval). To inhibit endogenous peroxidase activity, sections were kept in 3% hydrogen peroxide solution for 20 min and incubated in blocking solution (Thermo Fisher Scientific Inc., UK) for 5 min, thus blocking nonspecific binding sites. The sections were then incubated at room temperature for 1 h with a primary antibody (anti-CASP3 antibody (STJ97448), St John's Laboratory, London) followed by a biotinylated goat polyvalent antibody (Thermo Fisher Scientific Inc., UK) for 30 min. Then, all sections were washed with buffered phosphate saline (PBS, Biotech) were incubated with streptavidin-peroxidase (HRP, Thermo Fisher Scientific Inc., UK) at room temperature for 30 min. 3-3'-Diaminobenzidine (DAB, Thermo Fisher Scientific Inc., UK) was used as a chromogen, whereas Mayer's hematoxylin solution was used for nucleus staining. Negative controls were prepared by incubating tissue sections with PBS instead of primary antibodies. All stained sections were examined under a light microscope and digital images of the required areas were recorded.

Immunohistochemical Scoring Method

Allred scoring system was considered for immunohistochemical scoring as previously described (Qureshi and Pervez 2010, Özgermen et al., 2022) Ten different photographs of each animal, including the musculus sternocoracoideus pectoralis and musculus fibularis longus, were taken under a light microscope of 400× magnification. The Allred score between 0 and 8 was determined for each animal by combining the staining intensity score and the staining prevalence value. The mean value of 10 staining surface areas of each slide was accepted as the score of the relevant case.

Statistical Analysis

The collected data were analyzed by one-way ANOVA (one-way analysis of variance) using IBM SPSS Statistics v.22. Tukey's HSD test was performed to determine the significance of the differences between the mean values of the groups ($p < 0.05$).

On the 18th day of incubation, the myotube organization formed by the combination of myoblasts in both leg and pectoral muscle sections was completed in the control groups. The nuclei of the myoblasts that shaped the myotubes were oval and located in the center of the myotube. In addition, with the formation and organization of myofibrils, the transverse banding began to become evident, and the nuclei began to be pushed to the periphery (Figures 1A and 2A). On the other hand, It was observed that myotube organization was delayed (irregular myotubes) and transverse banding was weak in MSG groups. (Figures 1B-D and 2B-D). In contrast with the control groups, the MSG groups exhibited degenerative and necrotic changes such as muscle fiber degeneration, Zenker's necrosis, and mononuclear cell infiltrations (Figures 1B-D and 2B-D). Leg and pectoral muscle sections stained with immunohistochemical method of 18-day embryos, the most intense caspase-3 positive staining was observed in the MSG groups (Figure 3B-D, 3F-H).

On the 21st day of incubation, the transverse banding became quite evident in the control groups, the muscle fibers gained their normal histological structure, and the nuclei were just below the sarcolemma (Figures 4A and 5A). Compared to the control groups, the MSG groups exhibited an irregular formation of myotubes and weak transverse banding. In addition, histopathological evaluations revealed degenerative and necrotic changes such as muscle fiber degeneration, Zenker's necrosis, and mononuclear cell infiltrations in the MSG-treated groups (Figures 4B-D and 5B-D). Leg and pectoral muscle sections stained with immunohistochemical method of 21-day chick, the most intense caspase-3 positive staining was observed in the groups treated with 0.6 mg/g MSG and 1.2 mg/g MSG. The number of caspase-3-positive cells in the skeletal muscle was significantly higher in the MSG-administered groups than in the control groups ($p < 0.05$, Figure 6A-B, and Figures 7B-D and 7F-H).

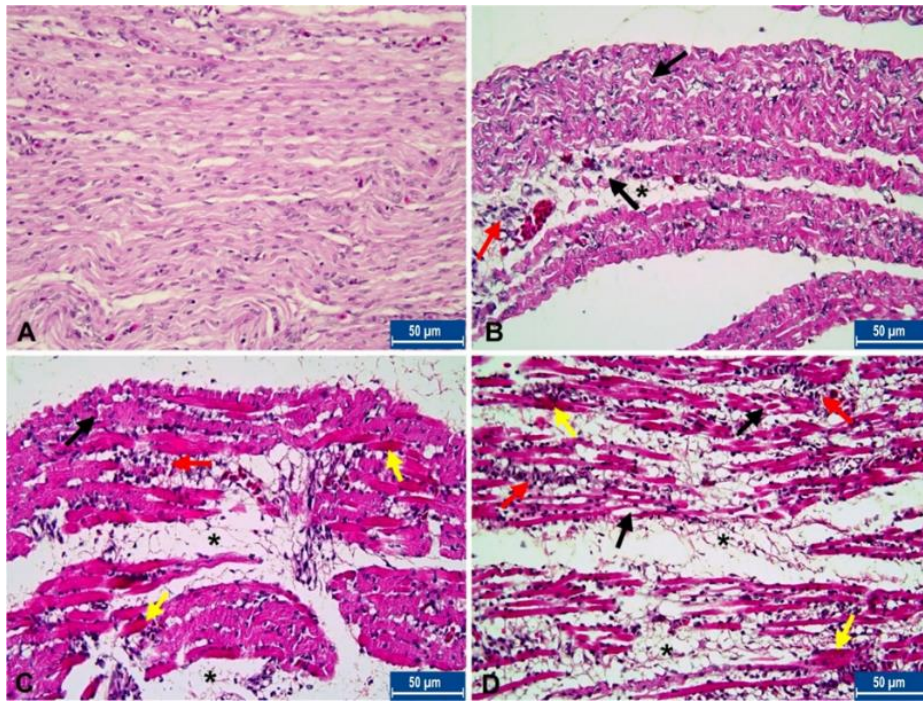


Figure 1. Sections of the leg muscle in the control (A), low-dose MSG group (B), medium-dose MSG group (C), and high-dose MSG group (D) on the 18th day of incubation. Compared to the control groups, myotube organization is delayed and transverse banding is weak in the MSG groups. Degenerating muscle fibers (black arrows), edema (stars), Zenker's necrosis in the muscle fibers (yellow arrows), and mononuclear cell infiltrations (red arrows) between the fibers in the MSG groups. H & E.

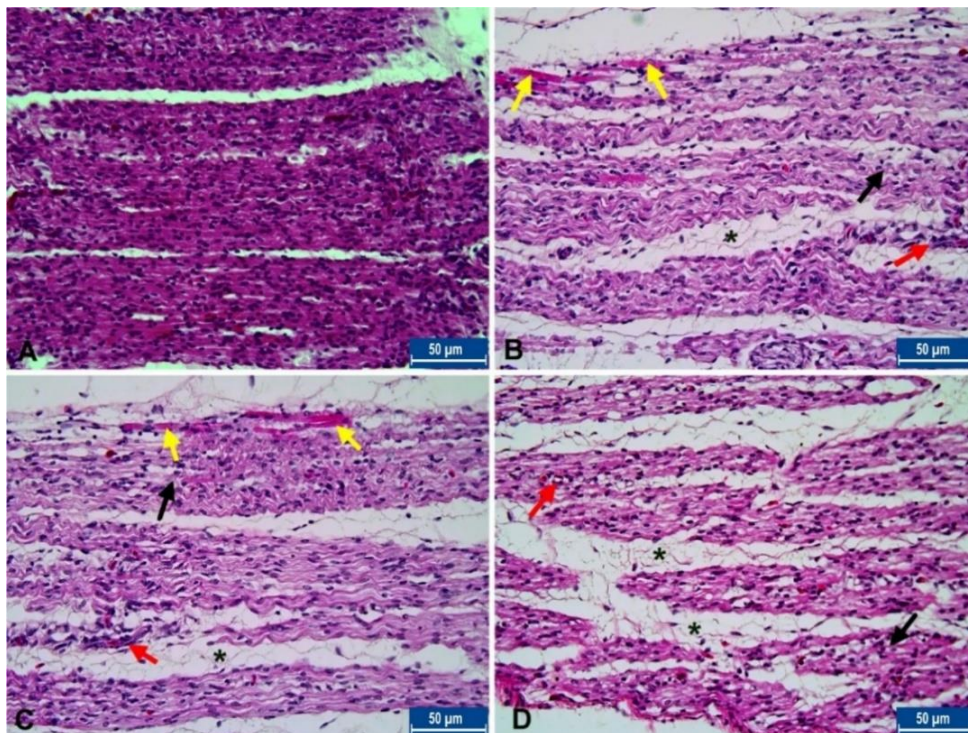


Figure 2. Sections of the pectoral muscle in the control (A), low-dose MSG group (B), medium-dose MSG group (C), and high-dose MSG group (D) on the 18th day of incubation. Compared to the control groups, myotube organization is delayed and transverse banding is weak in the MSG groups. Degenerating muscle fibers (black arrows), edema (stars), Zenker's necrosis in the muscle fibers (yellow arrows), and mononuclear cell infiltrations (red arrows) between the fibers in the MSG groups. H & E.

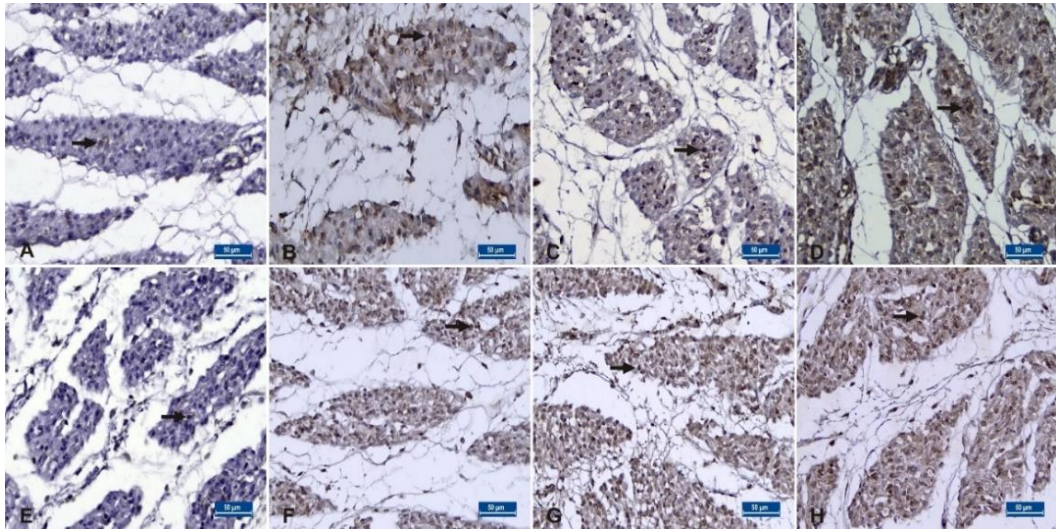


Figure 3. Leg muscle sections of chick embryos from the control (A), low-dose MSG group (B), medium-dose MSG group (C), and high-dose MSG group (D) on the 18th day of incubation. Pectoral muscle sections of chick embryos from the control (E), low-dose MSG group (F), medium-dose MSG group (G), and high-dose MSG group (H) on the 18th day of incubation. Compared to the control group (A, E), caspase-3 immunopositivity was more intense in the MSG groups. Anti-caspase-3 positive immunoreactions (arrows). Streptavidin-biotin-peroxidase method; bar: 50 µm.

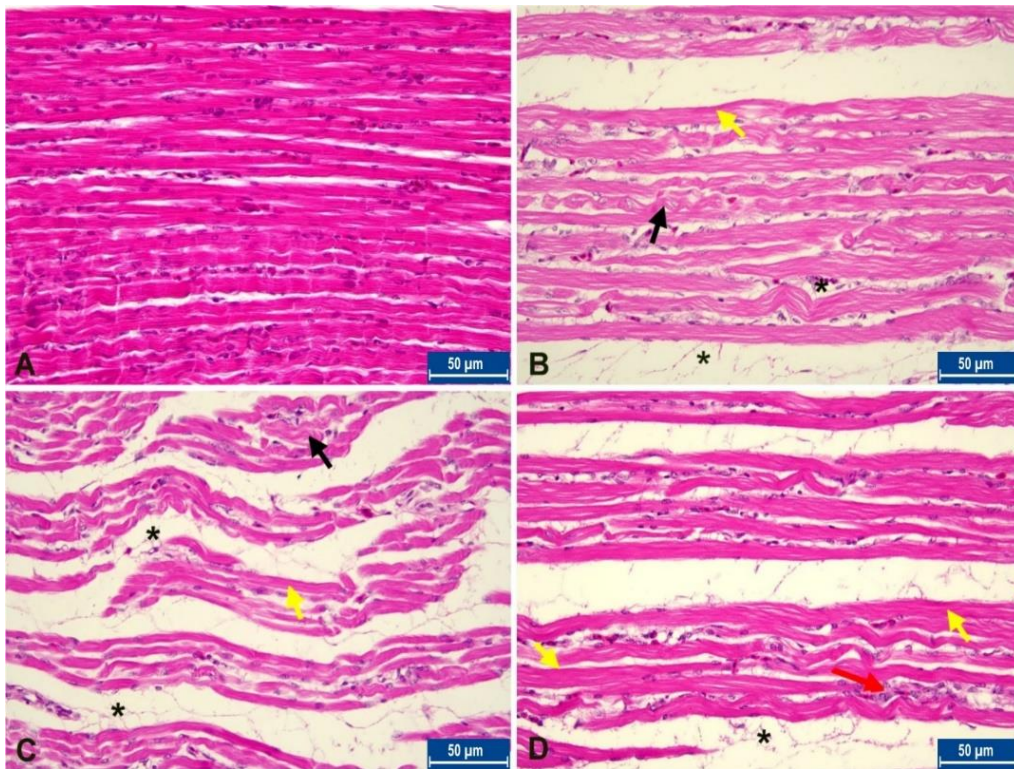


Figure 4. Sections of leg muscle in the control (A), low-dose MSG group (B), medium-dose MSG group (C), and high-dose MSG group (D) on the 21st day of incubation. Compared to the control groups, the MSG groups showed irregular formation of myotubes and weak transverse banding. Degenerating muscle fibers (black arrows), edema (stars), Zenker's necrosis in the muscle fibers (yellow arrows), and mononuclear cell infiltrations (red arrows) between the fibers in the MSG groups. H & E.

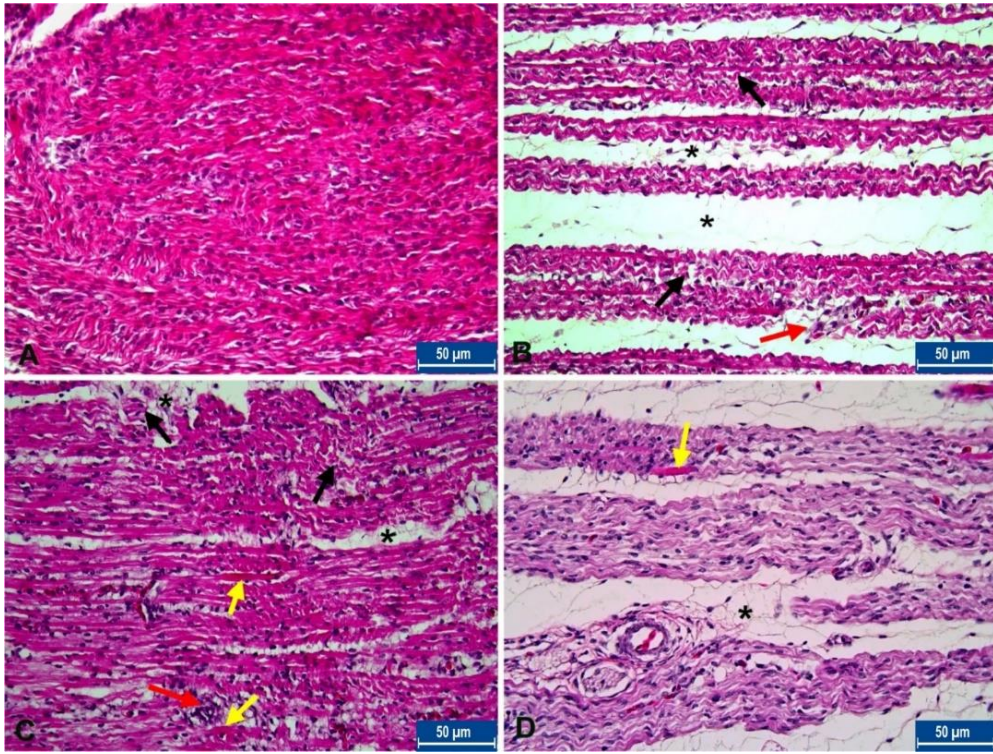


Figure 5. Sections of pectoral muscle in the control (A), low-dose MSG group (B), medium-dose MSG group (C), and high-dose MSG group (D) on the 21st day of incubation. Compared to the control groups, the MSG groups exhibited irregular formation of myotubes and weak transverse banding. Degenerating muscle fibers (black arrows), edema (stars), Zenker's necrosis in the muscle fibers (yellow arrows), and mononuclear cell infiltrations (red arrows) between the fibers in the MSG groups. H & E.

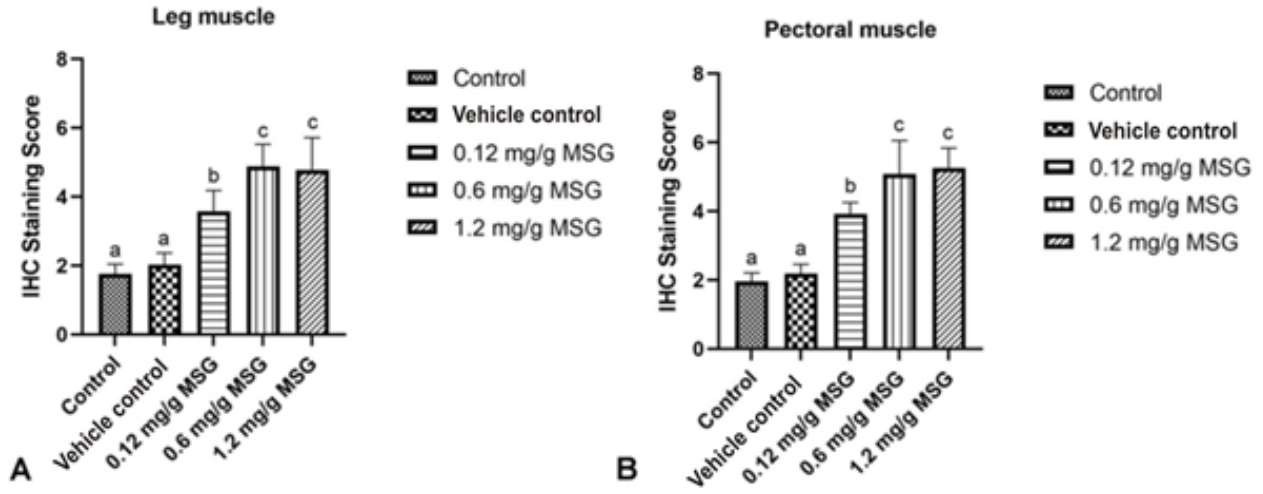


Figure 6. Immunohistochemical staining rates of caspase-3 in the leg and pectoral muscles at day 21 of incubation. Different superscript letters in the columns indicate statistical differences (mean \pm SD, $p < 0.05$).

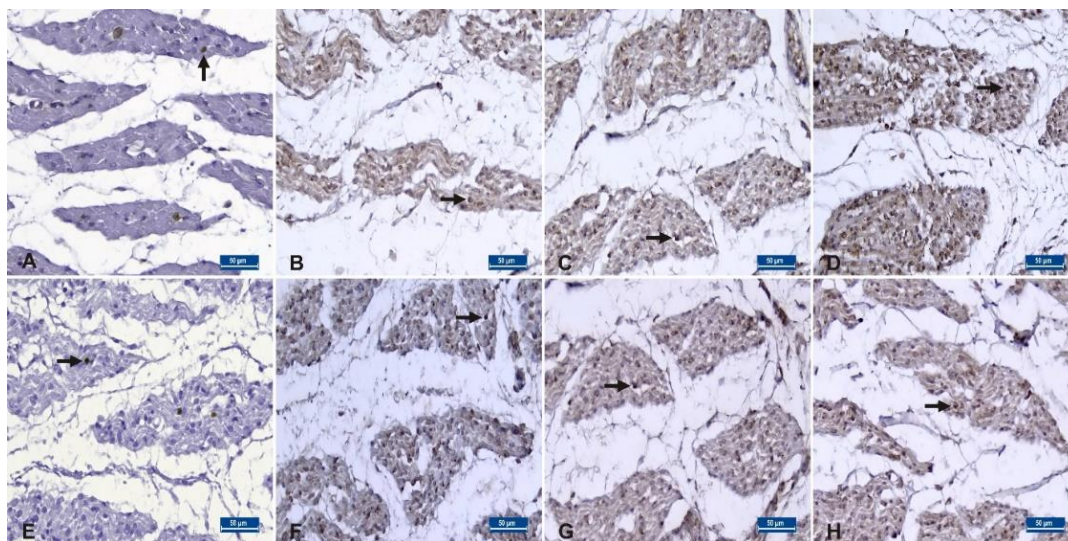


Figure 7. Leg muscle sections of chicks from the control (A), low-dose MSG group (B), medium-dose MSG group (C), and high-dose MSG group (D) on the 21st day of incubation. Pectoral muscle sections of chicks from the control (E), low-dose MSG group (F), medium-dose MSG group (G), and high-dose MSG group (H) on the 21st day of incubation. Compared to the control group (A, E), caspase-3 immunopositivity was more intense in the MSG groups. Caspase-3 positive cells (arrows). Streptavidin-biotin-peroxidase method; bar: 50 µm.

DISCUSSION

MSG has the appearance of a crystalline powder and is the most widely used additive as a flavor enhancer in processed foods (Chakraborty 2019). The acceptable daily intake level (ADI) for glutamic acid and its salts was determined by the FAO/WHO in 1970 as 120 mg/kg body weight. However, the safety of MSG was reevaluated by the European Food Safety Authority (EFSA) in August 2017, and the maximum daily intake of MSG was revised as 30 mg/kg body weight. Excessive consumption of foods high in MSG may have side effects for all individuals in the community and, particularly, for susceptible groups (children and adolescents) (Mortensen et al., 2017). MSG consumption has increased all over the world with the increase in ready-to-eat food consumption, with reported daily average intakes of 1 g in European countries and 4 g in Asian countries (Park et al. 2014). Recent studies have shown that MSG may also have

negative effects on many organs and tissues such as the digestive, reproductive, nervous, and immune systems (Jubaidi et al. 2019, Zanfircescu et al. 2019, Banerjee et al. 2021, Bölükbaş and Öznurlu 2022, Bölükbaş and Öznurlu 2023a, Bölükbaş and Öznurlu 2023b).

Chicken embryos are one of the most frequently used models to determine the embryotoxic, genotoxic, and teratogenic effects of agents such as drugs, toxins (Stoloff et al. 1972, Berg et al. 1999). Studies using fertilized chicken eggs do not express a unanimous opinion on the ways active substances can be administered to the egg for testing (Stoloff et al. 1972, Kemper and Luepke 1986, Öznurlu et al. 2012). The egg yolk serves as the counterpart of the placenta in

mammals and serves as the main food source for the offspring (Bauer et al. 2013). Generally, test solutions are injected into the egg at a volume of 20–100 µL (Berg 2000, Öznurlu et al. 2022).

It has been reported in previous studies that at the 12th and 16th days of incubation, secondary myofibrils originated from myoblasts that cluster and differentiate around the existing primary myofibrils (Henry and Burke 1998, Kikuchi 1971). In this study, the transverse bands started to become evident on the 18th day of incubation and the banding was quite evident on the 21st day. Among the groups given MSG, the myotubes were irregularly shaped. In addition, degenerative and necrotic changes such as muscle fiber degeneration, Zenker's necrosis, and mononuclear cell infiltrations were observed in the muscles of the MSG groups.

MSG causes physiological and behavioral changes, such as loss of muscle strength and decreased locomotor activity (Campos-Sepúlveda et al. 2009). MSG-supplemented foods have been reported to cause muscle stiffness, redness of the skin, burning in the chest and unusual pain sensations, migraines, atypical facial pain or pressure, and needle-pricking sensations (Schaumburg et al. 1969, Rhodes et al. 1991, Yang et al. 1997). MSG administration has been reported to cause biochemical and morphological changes in the heart tissue, as well as changes in heart rhythm (Baky et al. 2009, Liu et al. 2013, Kumar and Bhandari 2013). Swamy et al. (2014) administered 2 g/kg of MSG intraperitoneally to Wistar albino rats and reported that MSG caused behavioral and physiological changes (decreased locomotor activity and loss of muscle strength).

Other studies have reported that MSG administration causes a significant increase in the concentration of interstitial glutamate in the masseter muscle (Kitamura et al. 2010) and leads to a decrease in the afferent mechanical threshold (Cairns et al. 2007).

In previous studies, it has been reported that the agents exposed during the prenatal period adversely affect muscle development (Gündüz and Öznurlu 2014, Sadighara et al. 2013). Öznurlu et al. (2022) injected different doses of bisphenol A (BPA) into the yolk and reported that the embryonic development of the skeletal muscle was delayed in the BPA-treated groups and that the number of PCNA-positive cells was higher compared to the control. Mokhtar and Sewelam (2021) showed that MSG administration in neonatal albino rats caused disruption in the cardiac muscle fibers, extravasated hemorrhage, and massive degenerative changes such as nuclear pyknosis, necrosis, and cytoplasmic vacuolation in cardiomyocytes. Elwan et al. (2021) reported that aflatoxin B1 injected into the egg at different doses increased the expression of caspase-3 in the chick embryo. El Kotb et al. (2020) reported that strong positive caspase-3 immunoreactivity was observed in the cells of the interstitial spaces and seminiferous tubules in the groups given MSG. Mohamed and Mohamed (2021) reported an increase in positive caspase-3 immunoreactivity in the testis tissue of rats as a result of oral administration of MSG for 4 weeks.

In this study, the development of skeletal muscle was delayed in the MSG groups compared to the control groups. This delay was characterized by the formation of myotubes or the prolongation of their formation process. Caspase-3 immunopositivity reactivity was also found to be higher in the MSG groups on the 21st day of incubation than in the control groups, and a statistically significant difference was observed between the MSG groups administered different doses ($p < 0.05$). In particular, caspase-3 immunopositivity in the skeletal muscle was found to be significantly ($p < 0.05$) higher in the groups administered 0.6 and 1.2 mg/g MSG than in the group administered 0.12 mg/g MSG. Higher caspase-3 immunopositivity in the MSG groups may be due to degenerative and necrotic in muscle fibers changes and the presence of incomplete myotubes.

CONCLUSION

In conclusion, it was determined that in ovo administered MSG could adversely affect embryonic development of skeletal muscle tissue along with causing may be due to degenerative and necrotic in muscle fibers changes in developing the skeletal muscle.

Conflict of interest: The authors declared that there is no conflict of interest.

Authors Contribution Rate: The authors declare that they have contributed equally to the article.

Ethical Approval: This study has received permission with Selcuk University Faculty of Veterinary Medicine Experimental Animals Production and Research Center Ethics Committee number 2022/59 and 02.06.2022.

Financial support: No support was received during this study.

REFERENCES

- Abdel Moneim WM, Yassa HA, Makhoul RA, Mohamed NA.** Monosodium glutamate affects cognitive functions in male albino rats. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 2018; 8, 9.
- Adeyemo OA, Farinmade AE.** Genotoxic and cytotoxic effects of food flavor enhancer, monosodium glutamate (MSG) using *Allium cepa* assay. *African Journal of Biotechnology*, 2013; 12.
- Baky NA, Mohamed AM, Faddah LM.** Protective effect of N-acetyl cysteine and/or pro vitamin A against monosodium glutamate-induced cardiopathy in rats. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2009; 4(5), 178–193.
- Banerjee A, Mukherjee S, Maji BK.** Worldwide flavor enhancer monosodium glutamate combined with high lipid diet provokes metabolic alterations and systemic anomalies: An overview. *Toxicology Reports*, 2021; 8, 938-961.
- Bauer R, Plieschnig JA, Finkes T, Riegler B, et al.** The developing chicken yolk sac acquires nutrient transport competence by an orchestrated differentiation process of its endodermal epithelial cells. *J Biol Chem*, 2013; 288(2), 1088- 98.
- Berg C, Halldin K, Fridolfsson AK, Brandt I, et al.** The avian egg as a test system for endocrine disruptors: effects of diethyl stilbestrol and ethynylestradiol on sex organ develop. *Sci Total Environ*, 1999; 233(1-3), 57-6
- Berg C.** Environmental pollutants and there productive system in birds. PHD Thesis, Acta Universitatis Upsaliensis Faculty of Science and Technology, 2000; Uppsala.
- Bölükbaş F, Öznurlu, Y.** Yumurtaya verilen monosodyum glutamat'ın tavuk embriyolarında medulla spinalisin servikal bölgesinin embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. *J. Adv. VetBio Sci. Tech.*, 2021; 6, 298–311. <https://doi.org/10.31797/vetbio.%201015200>.
- Bölükbaş F, Öznurlu Y.** The determination of the effect of in ovo administered monosodium glutamate on the embryonic development of thymus and bursa of Fabricius and percentages of alpha-naphthyl acetate esterase positive lymphocyte in chicken. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022; 29, 45338-45348.
- Bölükbaş F, Öznurlu Y.** Determining the effects of in ovo administration of monosodium glutamate on the embryonic development of brain in chickens. *NeuroToxicology*, 2023a; 94, 87–97.
- Bölükbaş F, Öznurlu, Y.** Investigation of the Effects of Monosodium Glutamate on the Embryonic Development of the Eye in Chickens. *Veterinary Sciences*, 2023b; 10(2):99. <https://doi.org/10.3390/vetsci10020099>.

- Cairns BE, Dong X, Mann MK, Svensson P, Sessle BJ, Arendt-Nielsen L, & McErlane KM. Systemic administration of monosodium glutamate elevates intramuscular glutamate levels and sensitizes rat masseter muscle afferent fibers. *Pain*, 2007; 132(1-2), 33-41.
- Campos-Sepúlveda AE, Martínez Enríquez ME, Rodríguez Arellanes R, Peláez LE, Rodríguez Amézquita AL, Cadena Razo A. Neonatal monosodium glutamate administration increases aminooxyacetic acid (AOA) susceptibility effects in adult mice. *Proc West Pharmacol Soc.*, 2009; 52, 72-4.
- Chakraborty SP. Patho-physiological and toxicological aspects of monosodium glutamate. *Toxicology mechanisms and methods*, 2019; 29, 389-396. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1528649>.
- El Kotb SM, El-ghazouly DE, Ameen O. The potential cytoprotective effect of Vitamin C and Vitamin E on monosodium glutamate-induced testicular toxicity in rats. *Alexandria Journal of Medicine*, 2020; 56(1), 134-147.
- Elwan H, Xie C, Miao L, Dong X, Zou Xt, Mohany M, Ahmed MM, Al-Rejaie SS, Elnesr S. Methionine alleviates aflatoxin B1-induced broiler chicks embryotoxicity through inhibition of caspase-dependent apoptosis and enhancement of cellular antioxidant status. *Poultry Science*, 2021; 100, 101103.
- Gündüz N, Öznurlu Y. Adverse effects of aflatoxin B1 on skeletal muscle development in broiler chickens. *Br Poultry Sci.*, 2014; 55, 684-92.
- Hamza RZ, Diab AE-AA. Testicular protective and antioxidant effects of selenium nanoparticles on Monosodium glutamate-induced testicular structure alterations in male mice. *Toxicology Reports*, 2020; 7, 254-260.
- Henry MH, Burke WH. Sexual dimorphism in broiler chick embryos and embryonic muscle development in late incubation. *Poultry Science*, 1998; 77, 728-736.
- Jubaidi FF, Mathialagan RD, Noor MM, Taib IS, Budin SB. Monosodium glutamate daily oral supplementation: Study of its effects on male reproductive system on rat model. *Systems biology in reproductive medicine*, 2019; 65, 194-204.
- Kemper F, Luepke N. Toxicity testing by the hen's egg test (HET). *Food and chemical toxicology*, 1986; 24 (6-7), 647-648.
- Kikuchi T. Studies on development and differentiation of muscle III. Especially on the mode of increase in the number of muscle cells. *Tohoku J Agric Res*, 1971; 22, 1-15.
- Kingsley OA, Jacks TW, Amaza DS, Peters TM, Otong, ES. The Effect of Monosodium Glutamate (MSG) on the Gross Weight of the Heart of Albino Rats. *Sch. J. App. Med. Sci.*, 2013; 1(2):44- 47.
- Kitamura A, Sato W, Uneyama H, Torii K, Niijima A. Effects of intra gastric infusion of inosine monophosphate and L-glutamate on vagal gastric afferent activity and subsequent tautonomic reflexes. *The Journal of Physiological Sciences*, 2010; 61(1), 65-71. <https://doi.org/10.1007/s12576-010-0121-z>
- Kumar P, Bhandari U. Protective effect of *Trigonella foenum-graecum* Linn. On monosodium glutamate-induced dyslipidemia and oxidative stress in rats, *Indian J. Pharmacol.* 2013; 45, 136-140, <https://doi.org/10.4103/0253-7613.108288>.
- Latshaw WK. *Veterinary Developmental Anatomy*. Toronto, Philadelphia, 1987; p.184-204.
- Liu Y, Zhou L, Xu HF, Yan L, Ding F, Hao W, Gao X. A. Preliminary experimental study on the cardiac toxicity of glutamate and the role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor in rats. *Chinese Medical Journal*, 2013; 126 (7), 1323-1332.
- Mohamed HA, Mohamed MA. Possible Ameliorative Role of Ethanolic Ginger Extract (*Zingiber officinale*) against Testicular Toxicity Induced By Monosodium Glutamate In Albino Rats. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, B. Zoology*, 2021; 13(2), 285-300.
- Mokhtar HL, Sewelam AS. Impact of Monosodium Glutamate Intake on Heart Structure of Neonate Albino Rats and The Protective Role of Vitamin C. *Egyptian Journal of Histology*, 2021; 44, 787-804.
- Moore DT, Ferket PR, Mozdziak PE. Muscle Development in the late embryonic and early post-hatchpoult. *Int J Poultry Sci*, 2005; 4(3), 138-142.
- Mortensen A, Aguilar F, Crebelli R, Di Domenico A, Dusemund B, Frutos MJ, Galtier P, Gott D, Gundert-Remy U. Re-evaluation of glutamic acid (E 620), sodium glutamate (E 621), potassium glutamate (E 622), calcium glutamate (E 623), ammonium glutamate (E 624) and magnesium glutamate (E 625) as food additives. *EFSA Journal*, 2017; 15(7), 1-90.
- Özgermen BB, Yavuz O, Haydardeedeoğlu AE. Investigation of the effects of mesenchymal stem cell administration on liver recovery in experimental hepatotoxicity model. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 2022, 7(2), 185-193.
- Öznurlu Y, Özyaydın T, Sur E, Kuşat T. Yumurta sarısına enjekte edilen bisfenol A'nın tavuklarda iskelet kasi gelişimi üzerindeki etkileri. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 2022; 38(2), 90-100.
- Öznurlu Y, Celik I, Sur E, Özyaydın T, Oğuz H, Altunbaş K. Determination of the effects of aflatoxin B1 given in ovo on the proximal tibial growth plate of broiler chickens: histological, histometric and immunohistochemical findings. *Avian Pathol.*, 2012; 41(5), 469-77.
- Park E, Yu KH, Kim DK, Kim S, Sapkota K, Kim S-J, Kim CS, Chun HS. Protective effects of N-acetylcysteine against monosodium glutamate-induced astrocytic cell death. *Food and chemical toxicology*, 2014; 67, 1-9.
- Pavlović V, Cekić S, Kocić G, Sokolović D, Zivković V. Effect of monosodium glutamate on apoptosis and Bcl-2/Bax protein level in rat thymocyte culture. *Physiol Res.*, 2007; 56, 619-26.
- Qureshi A, Pervez S. Allred scoring for ER reporting and its impact in clearly distinguishing ER negative from ER positive breast cancers. *Journal Pakistan Medical Association*, 2010, 60, 350-353.
- Remignon H, Gardahaut MF, Marche G, Ricard FH. Selection for rapid growth increases the number and the size of muscle fibres with outchanging their typing in chickens. *J Muscle Res Cell Motil*, 1995; 16 (2), 95-102.
- Rhodes J, Titherley AC, Norman JA, Wood R, Lord DW. A survey of the monosodium glutamate content of foods and an estimation of the dietary intake of monosodium glutamate, *Food Addit. Contam.* 1991; 8 (5), 663-672, <https://doi.org/10.1080/02652039109374021>.
- Sadighara P, Khaniki GJ, Baseri E, Dehghani MH, et al. Effects of Bisphenol A on the quality characteristics of meat in a chicken embryo model. *Sci Int*, 2013; 11(1), 375-8.
- Schaumburg HH, Byck R, Gerstl R, Mashman JH. Monosodium L-glutamate: Its pharmacology and role in the Chinese restaurant syndrome. *Science*, 1969; 163 (3869), 826-828, <https://doi.org/10.1126/science.163.3869.826>.
- Stoloff L, Verrett MJ, Dantzman J, Reynaldo EF. Toxicological study of aflatoxin P1 using the fertile chicken egg. *Toxicology and applied pharmacology*, 1972; 23, 528-531.
- Swamy AH, Patel NL, Gadad PC, Koti BC, Patel UM, Thippeswamy AH, Manjula DV. Neuroprotective activity of *Pongamia pinnata* in monosodium glutamate-induced neurotoxicity in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014; 75(6), 657-663.

- Toth L, Karcsu S, Feledi J, Kreutzberg G.** Neurotoxicity of monosodium-L-glutamate in pregnant and fetal rats. *Acta neuropathologica*, 1987; 75, 16-22.
- Velleman SG.** Muscle development in the embryo and hatchling. *Poult Sci*, 2007; 86(5),1050-4.
- Yang WH, Drouin MA, Herbert M, Mao Y, Karsh J.** The monosodium glutamate symptom complex: assessment in a double-blind placebo-controlled randomized study, *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997; 99 (6 Pt 1), 757–762, [https:// doi.org/10.1016/s0091-6749\(97\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(97)80008-5).
- Zanfirescu A, Ungurianu A, Tsatsakis AM, Nițulescu GM, Kouretas D, Veskoukis A, Tsoukalas D, Engin AB, Aschner M, Margină D.** A Review of the Alleged Health Hazards of Monosodium Glutamate. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019; 18, 1111-1134.

Impact of Farm-Scale on Animal Management Practices in Pırlak Sheep Enterprises

Zehra BOZKURT^{1*}, Özlem GÜCÜYENER HACAN¹, Serdar KOÇAK¹, Koray ÇELİKELOĞLU¹,
Mustafa TEKERLİ¹, Metin ERDOĞAN²

¹ Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Husbandry, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

² Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Medical Biology and Genetics, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

ABSTRACT

This research was carried out to investigate the effects of farm scale on animal management practices in Pırlak sheep farms in the Emirdağ District of Afyonkarahisar province. A total of 56 Pırlak farms determined by simple random sampling were divided into three scale groups small (<50 heads), medium (51-100 heads), and large (>101 heads) based on sheep and ram numbers. The data were collected through measurements, observations, and face-to-face interviews with the farmers. The farm-scale significantly affected the feed production capacity, barn size, window area, lamp number, herd dog number, litter and manure removal frequencies, lamb production, penning the ewes with their lambs, and marketing of dairy products. The pasture-based extensive sheep production system was widespread in Pırlak farms, and the air quality, litter management, and frequency of equipment cleaning and manure removal were poorer than expected in those typical local sheep barns. Moreover, the farm's records related to production performance, animal diseases, and treatments were not kept. It has been understood that grazing, milking, lamb care, reproduction, and shearing processes were carried out with traditional methods, mostly without machinery. Since the Pırlak sheep breed is a hardy domestic breed adapted to this region for decades, improving efforts for the Pırlak sheep can increase the breed's performance. In conclusion, it has been concluded that the farm management capacities of Pırlak Farms in the Emirdağ can be supported with more financial government aid and farmers' training in sheep breeding, animal health and welfare, and business economics.

Keywords: Animal management practices, Emirdağ district, Farm-scale, Pırlak sheep farms

Pırlak Koyunculuk İşletmelerinde İşletme Büyüklüğünün Hayvan Yönetimi Uygulamalarına Etkisi

ÖZ

Bu araştırma Afyonkarahisar ili Emirdağ İlçesi'nde bulunan Pırlak koyunculuk işletmelerinde işletme büyüklüğünün hayvan yönetimi uygulamalarına etkisinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Basit tesadüfi örnekleme ile belirlenen 56 adet Pırlak koyunculuk işletmesi koyun ve koç sayısına göre küçük (<50 baş), orta (51-100 baş) ve büyük (>101 baş) ölçekli olmak üzere 3 gruba bölünmüştür. Araştırmanın verileri işletmelerde yapılan ölçüm, gözlem ve çiftçiler ile yüz yüze görüşmeler yoluyla elde edilmiştir. İşletme büyüklüğünün yem bitkisi üretimi kapasitesi, ağıl büyüklüğü, pencere alanı, ağıl içi lamba sayısı, sürü köpeği sayısı, altlık ve gübre uzaklaştırma sıklığı, kuzu üretimi, koyunların kuzulu koyun bölmerinde barındırılması ve süt ürünlerinin satışı üzerine önemli derecede etki yaptığı tespit edilmiştir. Genel olarak, Pırlak işletmelerinde meraya dayalı ekstansif yetiştiricilik yapıldığı, yöreye özgü tipik koyun ağıllarında hava kalitesi, altlık yönetimi, ekipman temizliği ve gübre uzaklaştırma sıklığının beklenenden daha zayıf olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca verim performansı, hayvan hastalıkları ve yapılan tedavilere ilişkin çiftlik kayıtların tutulmadığı görülmüştür. Otlama, sağım, kuzu bakımı, sıfat ve kırkım işlemlerinin geleneksel yöntemlerle ve ağırlıkla makine kullanmadan yapıldığı anlaşılmıştır. Pırlak koyun ırkı onlarca yıldır bu bölgeye uyum sağlamış dayanıklı yerli bir ırk olduğu için yapılacak ıslah çalışmaları bu ırkın performansını artırabilecektir. Sonuç olarak, Emirdağ'da bulunan Pırlak koyunculuk işletmelerinin hayvan yönetimi kapasitelerinin kamu mali teşviklerinin artırılması ve koyun yetiştiriciliği, hayvan sağlığı ve refahı ile işletme ekonomisi konularında çiftçilerin eğitimi ile desteklenebileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Emirdağ ilçesi, Hayvan yönetimi uygulamaları, İşletme büyüklüğü, Pırlak koyunculuk işletmeleri

To cite this article: Bozkurt Z, Gücüyener Hacan Ö, Koçak S, Çelikeloglu K, Tekerli M, Erdoğan M. Impact of Farm-Scale on Animal Management Practices in Pırlak Sheep Enterprises. Kocatepe Vet J. (2023) 16(1):57-69

Submission: 23.05.2022 Accepted: 22.02.2023 Published Online: 07.03.2023

ORCID ID: ZB: 0000-0001-8272-7817, ÖGH: 0000-0001-6340-1117, KÇ: 0000-0002-1610-2226, SK: 0000-0002-7832-887X, MT: 0000-0002-8634-1193, ME: 0000-0003-0975-1989

*Corresponding author e-mail: zhra.bozkurt@gmail.com

INTRODUCTION

Turkey is among the leading countries in sheep production in the world. The sheep population was 23.089.691 in 2010 Turkey, which increased to 31.507.934 in 2015 (TUIK 2019). There is a significant potential for small animal breeding with 778.120 sheep and 60.908 goats that can make the best use of pastures in Afyonkarahisar in 2015. Sheep breeding has been accomplished for generations in the Emirdağ District of Afyonkarahisar. The most typical features of traditional sheep breeding can also be seen in addition to modern livestock farms. Animal production efficiency depends on total animal numbers and the amounts of the product obtained per animal. The success of breeding efforts to increase the animal genetic capacity for yields is impressed by the conditions in which animals are raised. So, it is more than necessary to provide a proper environment, sufficient care, and feeding to obtain yields to the extent of the animal's genetic capacity.

Humans manage all procedures concerning sheep health and yields (Alcedo et al., 2015, Bokkers 2006, Bozkurt et al., 2013). For this reason, there is a need for a current situation analysis in sheep breeding to examine human-animal interactions, to increase the current animal health and welfare standards in sheep farms, and to increase the animal welfare knowledge and skills of those responsible for the care and management of sheep (Caroprese et al. 2016, Fedele et al. 1993, Fregonesi and Leaver 2001).

Animal management practices can affect human-animal interactions in traditional sheep farms (Le Neindre et al. 2004, Raina et al. 2017, Sejian et al. 2010, Sevi et al. 1999). Studies on the effects of farm scale on traditional sheep breeding are limited. This research aimed to determine the effects of farm scale on animal management practices in Pırlak sheep farms in the Emirdağ District of Afyonkarahisar.

MATERIAL AND METHOD

This research was carried out in the Emirdağ District of Afyonkarahisar in the Inner-West Anatolia Region. Considering the information obtained from the Afyonkarahisar Provincial Directorate of Agriculture and Forestry, the farms in which only Pırlak sheep are raised (594 farms) were specified in the Emirdağ district. Sampling was used due to constraints such as time, cost, and distance, and a simple random cluster sampling method was applied considering the geographical distribution of Pırlak Farms in the Emirdağ district (Ural and Kılıç 2013). The Yüreğil village was appropriate in terms of the implementation of the research survey (Latitude: 39°1'31.82"N; Longitude: 31°1'29.99" E). There were only Pırlak sheep farms in all three neighborhoods of the village. The formula suggested by Sekaran (2003), was used in determining the sample scale with 95% reliability and a 6% sampling error.

The formula is given below;
$$n = \frac{N \cdot P \cdot Q \cdot Z_{\alpha/2}}{(N-1) \cdot d^2 + P \cdot Q \cdot Z_{\alpha/2}}$$

From the parameters in the formula, N=594, P=50%, Q=50%, the theoretical value corresponding to the significance level of 0.05 $Z_{\alpha/2}=1.96$, d=6% is taken, and the minimum sample scale was calculated as 72 farms. In this context, all 74 farms in Yüreğil Village were visited. Statistical analyses were made on the data collected from 56 farms that were active at the time of the visit and accepted to participate in the research and had a 20 sheep capacity or more. The farms were assigned to small (<50 heads), medium (51-100 heads), and large (>101 heads) enterprise scale groups taking into account the total number of sheep and rams in the farms. The research was conducted on 15, 20, and 21 farms in small, medium, and large-scale groups, respectively. A measurement, observation, and evaluation form were developed and used to collection research data related to agricultural activities, land characteristics, and animal existence of Pırlak sheep farms. Additionally, the practices related to sheep feeding, housing, health and welfare management, and managing pregnant animals and lambs were observed and examined on the farms. Also, information and data on animal management were obtained through face-to-face interviews with the farmers. Descriptive statistics such as frequency, percentage distribution, arithmetic mean, and standard error in the mean were assessed to analyze the collected data. In addition, the One-Way ANOVA test (P1) was applied in the quantitative data analysis to compare the farm-scale groups regarding the parameters examined. The Person Chi-Square test (P2) was performed for the qualitative data.

RESULTS

The feed crops (barley, wheat, oat, and alfalfa) were produced in 57.58% of the Pırlak farms, and the average arable land was 43 decades. The results of the agricultural assets owned and management of input and storage in Pırlak Farms are presented in Table 1. Small-scale enterprises were not landowners; as the farm scale increased, so did the land availability in the other two scale groups. The average number of ewes and rams (83.39 heads) raised in Pırlak farms during the last 12 months also increased significantly as the farm scale increased. There was a storage area in 69.09% of farms (average of 44.39 m²) for feed, medicine, and equipment, but the storage area did not significantly increase with the farm scale. The struggle with rodents, especially in feed storerooms, was managed with cats and mousetraps. Rodenticide was used only in some large-scale (5%) enterprises. There was no manure depot in 83.93% of Pırlak farms, and the farm scale did not affect this parameter.

The results concerning sheep barns and housing management in Pırlak farms are given in Table 2. The sheep barns' dimensions (width, length, and total barn area) differed significantly ($p < 0.05$, $p < 0.01$) in the farm-scale groups. Barn heights were similar in all the groups. Although the share of covered area per animal was not statistically different between farm-scale groups, it was somewhat low, especially in small- and large-scale farms. The farm-scale affected the average number of windows ($p < 0.01$) and the total window area of the barns ($p < 0.01$), but it was not affected the numbers or dimensions of barn doors and the traits of chimneys and courtyards. As the farm-scale increased, the number of lamps used in the barn increased ($p < 0.01$), but the farm scale did not affect the lamp type. The farm-scale did not affect the parameters such as barn type, barn construction and wall condition, shelter availability, and roofing materials. Only 16.07% of the farms had shelter. "I" type barns were observed in 96.43%, and all barn units were under a single roof in 87.50 % of the farms. The barn's wall construction was rubble stone masonry in 64.29%, and stone reinforced concreted in 3.56% (ashlar random masonry with brick and stone), and a mixture of materials such as stone, wood, and adobe in 32.15% of farms. Barn walls were plastered in 30.36% of the farms. The ratios of Pırlak farms that used tile or wood for roofing sheep pens were calculated as 96.43% and 3.57%. The farm scale did not affect the parameters such as barn type, barn construction and wall condition, shelter availability, and roofing materials.

The results on the management of animal feeding and grazing in the Pırlak farms are given in the Table 3. Portable feeders and drinkers were used on all farms. In all of the Pırlak farms, it was observed that water was supplied from the city water network so that animals could reach clean water resources. It has been detected that automatic equipment was not used in all sheep farms, and there was no generator. As seen in Table 3, the average daily feed and water meals were 1.07 and 1.11, and these parameters were not affected by the farm scale. The animals grazed an average of 263.64 days per year (an average of 226.02 days at night and 37.63 days at daytime), and the effect of the farm scale was insignificant. In addition, it has been determined that there was no drinking water supply in the pasture. It was determined that the number of herd dogs performing in herd management and safeguarding was significant ($p < 0.01$) affected by the farm scale, more dogs were employed in medium-scaled enterprises, and two out of three were male dogs ($p < 0.05$). Additionally, the daily animal feed allocation was supplied with a thin box in 96.43% of the farms and with bales in 3.57%.

The results related to animal health and welfare management in Pırlak farms are shown in Table 4. The farm scale did not significantly affect the feeder and waterer cleaning frequencies, barns disinfection frequency, and barn floor conditions such as slope and drainage. The frequency of litter and manure removal from the barn was lower for large-scale farms ($p < 0.05$). There were neither disinfection procedures for people

and vehicle motions at entrances and exits, nor were dip baths for sheep during treatments against ectoparasites. The results on the management of milking, shearing, and marketing in Pırlak farms are presented in Table 5. The Pırlak farms had no milking chamber or milk cooling system. Though the farm scale did not affect the daily milking frequency, milking time, and milk usage method, it was reported that the milk produced in the farms was used for family consumption (46.43%) or marketed as traditional dairy products (53.57%). Pırlak farms were shearing sheep mostly in June (94.64%), and the most preferred method was shearing manually with scissors (96.43%). The keeping conditions of shearing equipment were not appropriate (96.43%). Also, there was no particular shearing area, and the farmers said they sold the fleece. The farmers mentioned using the milk they produced to make traditional dairy products such as yogurt and local cheese. The effects of the farm scale were significant ($p < 0.05$) for milk and milk product marketing but insignificant for manure dispose and marketing.

The findings related to the management of the care of pregnant and lactating ewes and lambs and breeding in the Pırlak farms are given in Table 6. The free mating method was practiced in all farms. The rams were always kept with sheep, including those pregnant in 85.70% of the farms. The farm-scale significantly affected the number of ewes that were lambing and the number of single or twin lambing ($p < 0.01$). The farm-scale was not meaningful for the first colostrum intake time, weaning age, suckling frequency, weighting and fattening of the lambs, and the orphaned lamb feeding method. The farmers reported that the first colostrum meal time of the lambs was 11.21 hours after birth. Dry grass was given to the lambs after an average of 8.05 days; the average weaning age was 143.36 days. All of the Pırlak farms used the age criterion for weaning. All newborn lambs were identified by ear tags and were vaccinated against Sheep and Goat Plague, Foot and Mouth Disease, Brucella, and Enterotoxemia. In all farms, the lambs were not regularly weighed for growth checks. The farm scale's effect was insignificant regarding the availability of lamb pens, rams pens, and lambing pens in the barns. The farm-scale affected the housing of ewes with their lambs up to the weaning age ($p < 0.05$). The farm's ratio of the farms penning lambs with ewes was higher (89.29%) than the farms penning lamb and ewes (10.71%) separately. The method used for feeding orphaned lambs were milk bottle suckling (1.79%) or cross-fostering of lambs to another lactating ewe voluntarily (12.50%) or involuntarily (85.71%). The farm-scale effect was insignificant for this parameter.

Table 1. The results regarding the agricultural assets owned, and the management of input and storage in the Pirlak farms

Parameters	Traits	Farm Scale			Total	P1	P2
		Small	Medium	Large			
Herd (head)	Rams +Ewes	34.20±1.51 ^c	65.57 ±2.82 ^b	141.10 ±8.36 ^a	83.39±6.78	0.000	
Storage	Storage area (m ²)	36.30±4.23	47.38±6.52	47.20±6.21	44.39±3.50	0.395	
Storage availability (%)	Yes	71.43	61.90	75.00	69.09		0.647
	No	28.57	38.10	25.00	30.91		
Feed storage conditions (%)	Partially suitable	13.33	33.33	50.00	33.33		0.084
	Insufficient	86.67	66.67	50.00	66.67		
Rodent struggle method (%)	Cat	6.67	14.29	20.00	14.29		0.521
	Cat+ mousetrap	93.33	85.71	75.00	83.92		
	Cat+ mousetrap+ rodenticide	0.00	0.00	5.00	1.79		
Manure storage (%)	Yes	13.33	28.57	5.00	16.07		0.115
	No	86.67	71.43	95.00	83.93		
Forage crop production (%)	Yes	13.33	42.86	40.00	33.93		0.141
	No	86.67	57.14	60.00	66.07		

P1=One-Way ANOVA test was applied to analyse the quantitative data. P2=Person Chi-Square test was performed for the qualitative data.

Table 2. The results concerning sheep barns and the management of sheep housing in Pirlak farms

Parameters	Traits	Farm Scale			Total	P1	P2
		Small	Medium	Large			
Sheep barn	Width (m)	5.60±0.273 ^b	7.63±0.51 ^{ab}	11.47±2.09 ^a	8.43±0.83	0.012	
	Length (m)	12.40±1.47 ^b	13.55±1.43 ^b	19.40±2.30 ^a	15.36±1.13	0.021	
	Height (m)	2.56±0.18	2.67±0.17	2.20±0.25	2.46±0.12	0.253	
	Total barn area(m ²)	69.80±9.56 ^b	109.58±20.62 ^b	202.05±35.30 ^a	131.11±16.49	0.003	
Window	Number	1.86±0.25 ^b	2.00±0.21 ^b	3.70±0.31 ^a	2.58±0.19	0.001	
	Width (cm)	65.46±5.45	87.45±7.87	70.32±6.14	75.69±4.15	0.067	
	Length(cm)	72.38±5.31	87.75±3.99	86.79±4.88	83.56±2.80	0.152	
	Area (m ²)	0.85±0.15 ^c	1.65±0.29 ^b	2.44±0.30 ^a	1.72±0.18	0.001	
Chimney	Number	0.86±0.29	0.81±0.31	1.37±0.34	1.02±0.19	0.395	
	Width(cm)	26.67±2.11	27.50±1.64	27.38±3.87	27.26±1.93	0.987	
Barn door	Height (cm)	180.00±6.05	182.05±4.49	180.50±7.81	180.95±3.58	0.972	
	Width (cm)	165.50±8.43	193.00±12.96	192.58±11.95	186.24±7.07	0.262	
Courtyard (m)	Width (m)	8.27±1.03	9.52±0.79	12.15±1.41	10.13±0.67	0.057	
	Length(m)	17.67±5.97	16.81±1.14	21.20±1.75	18.61±1.75	0.541	
Lamp number	Number	2.13±0.19 ^b	2.62±0.20 ^b	3.35±0.21 ^a	2.75±0.13	0.001	
Lamp type (%)	Tungsten	100.00	90.48	90.00	92.86		0.454
	Fluorescent	0.00	9.52	10.00	7.14		
Courtyard fencing (%)	Stone	6.68	14.29	15.00	12.50		0.725
	Wire	93.32	85.71	85.00	87.50		
Shelter availability (%)	Yes	6.67	28.67	10.00	16.07		0.138
	No	93.22	71.43	90.00	83.93		
Barn type (%)	I type	100.00	100.00	90.00	96.43		0.155
	L type	0.00	0.00	10.00	3.57		
Barn construction (%)	Rubble stone masonry	66.67	61.90	65.00	64.29		0.937
	Stone reinforced concreted	0.00	4.76	5.00	3.56		
	Mix.(stone+wood+adobe)	33.33	33.34	30.00	32.15		
Barn wall condition (%)	Plastered	13.33	38.10	35.00	30.36		0.240
	Unplastered	86.67	61.90	65.00	69.64		
Barn units (%)	Single roof	100.00	85.71	80.00	87.50		0.199
	Seperate roofs	0.00	14.29	20.00	12.50		
Roofing material (%)	Tile	100.00	90.48	100.00	96.43		0.178
	Wooden	0.00	9.52	0.00	3.57		

P1=One-Way ANOVA test was applied to analyse the quantitative data. P2=Person Chi-Square test was performed for the qualitative data.

Table 3. The results on the management of animal feeding and grazing in Pirlak farms

Parameters	Traits	Farm Scale			Total	P1	P2
		Small	Medium	Large			
Daily frequency	Feeding (times)	1.00±0.00	1.24±0.12	1.05±0.05	1.11±0.05	0.106	
	Watering (times)	1.00±0.00	1.05±0.05	1.15±0.08	1.07±0.04	0.211	
Grazing	Nights (days)	226.27±5.82	221.24±10.5	230.85±5.64	226.02±4.66	0.685	
	Daytimes (days)	46.73±5.57	37.76±5.92	30.65±4.43	37.63±3.29	0.162	
	Total (days)	273.00±2.00	259.00±7.54	261.50±4.42	263.64±3.17	0.195	
Herd dogs(head)	Male dog	1.47±0.17 ^b	2.05±0.15 ^a	2.00±0.15 ^a	1.88±0.92	0.024	
	Female dog	0.80±0.14 ^b	0.71±0.17 ^b	1.20±0.16 ^a	0.91±0.09	0.007	
	Total	2.20±0.11 ^c	2.76±0.21 ^b	3.20±0.19 ^a	2.77±0.12	0.002	
Feed supply (%)	Purchase	93.34	71.43	70.00	76.79		0.206
	Produced +Purchase	6.66	28.57	30.00	23.21		
Feed supply type(%)	Thin box	100.00	100.00	90.00	96.43		0.155
	Bale	0.00	0.00	10.00	3.57		

P1=One-Way ANOVA test was applied to analyse the quantitative data. P2=Person Chi-Square test was performed for the qualitative data.

Table 4. The results on management of animal health and welfare in Pırlak farms

Parameters	Traits	Farm Scale			Total	P1	P2
		Small	Medium	Large			
Feeder cleaning frequency (times/month)		3.43±1.18	3.24±0.74	5.00±1.15	3.93±0.59	0.388	
Water cleaning frequency (times/year)		3.00±0.92	2.95±0.76	5.80±1.36	3.98±0.630	0.098	
Barn disinfection frequency(times/year)		1.00±0.00	1.10±0.07	1.15±0.08	1.09±0.04	0.315	
Frequency of litter and manure removal from the barn (times/year)		1.27±0.12 ^a	1.29±0.10 ^a	1.00±0.00 ^b	1.18±0.05	0.033	
Barn disinfection (%)	With slaked lime	93.33	90.48	100.00	94.64		0.386
	No	6.67	9.52	0.00	5.36		
Floor slope (%)	Yes	0.00	0.00	5.00	1.85		0.421
	No	100.00	100.00	95.00	98.15		
Barn floor drainage (%)	Sufficient	100.00	90.48	75.00	87.50		0.075
	Insufficient	0.00	9.52	25.00	12.50		
Farm records (%)	Recording	0.00	0.00	5.26	1.85		0.391
	No	100.00	100.00	94.74	98.15		

P1=One-Way ANOVA test was applied to analyse the quantitative data. P2=Person Chi-Square test was performed for the qualitative data.

Table 5. The obtained results on the management of milking, shearing, and marketing in Pırlak farms

Parameters	Traits	Farm Scale			Total	P1	P2
		Small	Medium	Large			
Milking	Daily milking frequency	1.00±0.00	1.10±0.07	1.00±0.00	1.04±0.03	0.169	
	Milking time (minutes)	30.42±0.42	41.67±5.63	43.18±8.32	38.78±3.36	0.280	
Product price	Cheese (kg/TL)	40.00±0.00	41.43±2.10	45.00±0.00	41.82±1.55	0.639	
	Yogurt (kg/TL)	4.00±0.00	4.17±0.17	4.17±0.17	4.14±0.10	0.856	
	Wool (kg/TL)	3.00±0.32	2.83±0.19	2.68±0.21	2.80±0.13	0.651	
Dairy product marketing(%)	Yes	20.00 ^b	61.90 ^a	70.00 ^a	53.57		0.008
	No	80.00	38.10	30.00	46.43		
Milk product types (%)	Yogurt	40.00	23.81	15.00	25.00		0.346
	Cheese+Yogurt	60.00	76.19	80.00	73.21		
	Local cheese	0.00	0.00	5.00	1.79		
Shearing time (%)	June	93.33	95.24	95.00	94.64		0.965
	July	6.67	4.76	5.00	5.36		
Shearing method (%)	Shearing with scissor	100.00	95.24	95.00	96.43		0.684
	Shearing with machine	0.00	4.76	5.00	3.57		
Keeping condition of shearing equipment	Appropriate	0.00	9.52	0.00	3.57		0.178
	Not appropriate	100.00	90.48	100.00	96.43		
Manure disposing (%)	Marketing	13.33	0.00	0.00	3.57		0.056
	Fertilizing into own field	60.00	71.43	45.00	58.93		
	Throw away	26.67	28.57	55.00	37.50		

P1=One-Way ANOVA test was applied to analyse the quantitative data. P2=Person Chi-Square test was performed for the qualitative data.

Table 6. The results related to the management of breeding and care of pregnant and lactating ewes in Pırlak farms

Parameters	Traits	Farm Scale			Total	P1	P2
		Small	Medium	Large			
Number of lambing sheep (head)		31.13±1.66 ^c	60.80±3.99 ^b	135.25±7.93 ^a	79.78±6.74	0.000	
Number of single lambing sheep(head)		26.27±1.36 ^c	47.25±3.27 ^b	108.25±6.79 ^a	63.71±5.45	0.000	
Number of twin lambing sheep (head)		4.87±0.87 ^c	13.55±1.91 ^b	26.80±3.12 ^a	16.00±1.79	0.000	
First colostrum intake time (hours)		12.80±1.31	11.24±0.87	10.00±0.60	11.21±0.53	0.121	
Weaning age (days)		147.00±3.21	145.14±3.20	138.75±3.35	143.36±1.93	0.192	
Frequency of suckling (times/day)		1.00±0.00	1.19±0.09	1.10±0.07	1.11±0.04	0.196	
Availability of indoor pen (%)	Lamb pen	100.00	85.71	80.00	87.50		0.507
	Ram pen	0.00	9.52	15.00	8.93		
	Lambing pen	0.00	4.76	5.00	3.57		
Regular lamb weighing (%)	Yes	0.00	0.00	10.00	3.57		0.155
	No	100.00	100.00	90.00	96.43		
Lamb fattening (%)	Yes	6.66	14.29	5.00	8.93		0.545
	No	93.34	85.71	95.0	91.07		
Penning lambs with ewes (%)	Yes	100.00 ^a	76.19 ^b	95.00 ^a	89.29		0.044
	No	0.00	23.81	5.00	10.71		
Orphaned lamb feeding method (%)	Suckling	0.00	0.00	5.00	1.79		0.198
	cross-fostering-volunteer	20.00	19.05	0.00	12.50		
	cros-fostering-unvolunteer	80.00	80.95	95.00	85.71		

P1=One-Way ANOVA test was applied to analyse the quantitative data. P2=Person Chi-Square test was performed for the qualitative data.

DISCUSSION

As the farm scale increased, the number of sheep and rams increased. It was observed that lambs were sold after weaning, especially in small-scale enterprises. This situation shows that lambs are sold to provide subsistence for the family and to purchase production inputs for farms, such as feed. It was detected that two-thirds of the enterprises still need to produce feed. These results generally agree with medium- and small-scale sheep farming (Mthi et al. 2017). These results show that the feed input of Pırlak enterprises in the Emirdağ district heavily depends on foreign sources. The scarcity of land to produce fodder crops makes it difficult to meet the cost of animal feed in these enterprises, which are already engaged in sheep breeding to ensure family livelihood. Fourie et al. (2018) also reported that insufficient land availability and inadequate agricultural equipment are the most critical problems in family sheep farms with a similar structure in their study in rural areas of South Africa. We observed storage rooms in two-thirds of the sheep farms, but the capacity of the storage rooms needed to be more proportional to the farm scale. This finding showed that the storage area needed to be improved, especially in large enterprises. However, it was evaluated that the storage room conditions (such as ventilation, storage, floor, and cleaning) were poor for small and medium- scaled enterprises. In feed storage rooms, it was seen that the struggle against rodents was done with cat and mouse traps, and rodenticide was used for this purpose in very few large-scale (5%) enterprises. Although the success of this traditional control method can be arguable in dealing with rodents, this method could reduce possible poisoning cases due to rodenticide consumption as well as sheep deaths. According to Tokur et al. (2021), insecticides and rodenticides constitute the most critical part of animal poisoning cases. The rodent problem is considered more prominent because of the cost, especially in small and medium-scale enterprises. Steen et al. (2005) reported a significant interaction between sheep density and rodent population, and the number of rodents decreases as the number of sheep decreases in the sheep housing areas.

As the number of animals on the farm increased, the area of the barn also increased. However, the barn's height did not change significantly, suggesting that the air and ground quality decreased with the increased number of animals in the barn. Moreover, in large-scale enterprises with the highest animal number, the problems related to ventilation and moisture management in these crowded barns were getting deeper. As the farm scale increased, the average number of barn windows (1.86-3.70) and total window area (0.85-2.44 m²) increased. Although this situation provides an advantage for these

naturally ventilated barns, the average chimney opening was low. This may have caused the barn's comfort and air quality levels unsuitable (Tuytens 2005, Caroprese 2008, Stafford and Gregory 2008, Wadhvani et al. 2016). The total microorganism and coliform budget in the barns' air was reported to be significantly lower in barns with a 2 m²/head living area compared to more crowded barns (1.5 or 1 m²/head) (P<0.05) (Sevi et al. 1999).

In the study, the number of animals increased parallel with the farm's scale, but the barns' physical structure and the conditions affecting the animals were similar in all farm scale groups. On all farms, the barns were earthen-floored, the barn walls were constructed of rubble stone masonry and were unplastered, and all barn units were under one single roof. These local and traditional corrals were very restrictive for animals and needed more administrative flexibility (Sevi et al. 1999). On the other hand, it has been reported that socio-cultural and ecological risks that arise from animal farming are lower in this type of sheep breeding compared to large intensive farms (Middleton 2013, Babai and Molnár 2014).

It was detected that the feeders and drinkers were portable and suitable for group use, and ideal for sheep drinking. The animal feeding management, mainly based on pasture, was supplemented with roughage and concentrated feeding once a day in the barn. However, determining the animals' daily feed allowance was not considered to age, yield, or other physiological needs of the animals. The feed was poured into the group feeders with standard scales such as buckets or tins without considering the feed content. In addition, water was provided once or twice a day when the animals were in the yard or after their return from the pasture. These findings are interesting regarding the success of feeding management in enterprises. Because this feeding management can lead both obstruct the feed intake of recessive animals that were in the social order by superior animals, and the feed intake according to the needs of each animal could not be guaranteed. While this situation increases the heterogeneity in the flock in terms of live weight, it may also cause a decrease in meat yields for a fattening period or excessive weight loss (Phillips et al., 2014). In addition, it was thought that the knowledge and skills in animal feeding management and animal behaviours of the farmers might need to be improved because the farmers reported that they learned sheep breeding from their family elders and neighbour farmers (Phythian et al. 2014).

Sheep were grazed between spring and autumn if the pasture grass capacity was appropriate. After their return to the barns, animals were supplemented with concentrated feed. This feeding management is standard for extensive sheep breeding (Dwyer 2009). However, Spigarelli et al. (2020) report that grazing has several other benefits. With grazing, there is a chance of getting rid of unfavourable indoor housing conditions, the sheep reaching fresh roughage, and the hoof health is positively affected by exercise (Dwyer 2009, Liu et al. 2012). As a traditional model, this feeding management was similar for farm-scale groups. Expectedly, as the farm scale increased, the number of sheep and herding dogs increased (2.20-3.20 heads). This result shows that dogs have a dominant role in herd management. In almost every business, male and female dogs worked together for sheep flock management. Flock dogs protect the sheep from predators and help to prevent economic losses due to predator attacks. On the other hand, Goddard (2011) reported that sheep perceive shepherd dogs as predators and that the primary reaction of sheep against herding dogs is avoidance or distance. For this reason, the ability and skill of herding dogs to manage the herd are essential. Lawson (1989) reported that predator attacks cause significant economic losses due to lamb and sheep deaths and injuries.

There were no differences between farm scale groups for manure removal frequency. In general, the effect of farm scale on animal health and welfare management was insignificant. However, the frequency of manure removal was low in large-scale farms. Caroprese (2008) also reported that poor housing conditions harm udder health and increased mastitis risk, and there is a relationship between low yield and low milk quality. Phythian et al. (2014) reported that veterinarians could work with sheep farmers to increase production and operating profitability and help farmers develop and implement herd health programs.

Half of the farms (53.57%) produced local dairy products (yogurt and cheese) and marketed them to local bazaars. Similarly, fleece was sold at all farms. The ratio of the farms selling sheep manure was only 3.57%. These results showed that regardless of the scale of the farms, Pırlak farms did not have a professional management approach in product marketing, and they had traditional management suitable for local and regional conditions. It was argued that the difficulties in marketing raw milk and the high demand for local yogurt and cheese in local markets induced these results. However, it has been observed that there are no specific standards or favourable marketing channels for producing and marketing these products. It has been evaluated that the farmers need more marketing knowledge and skills. Indeed, Fourie et al. (2018) stated that poor

marketing skills are among the limiting factors faced by small-scale farms.

Sheep and rams were housed in the same barns on the farms. Only 3.57% of the farms had lambing pens, and the newly giving birth ewes stayed with their lambs for a few days in these pens. In 87.50% of the farms, the weaned lambs or sheep were grazed on the pasture, while the suckled lambs were kept in the lamb pens. The management processes for the ewes that gave birth or the care of the lambs were not different. These findings reveal concerns about the sensitive care and animal management requirements to be met in farms with more animals and lambs. As the scale of the farm increased, it was seen that the number of sheep that gave birth and that were reformed was also higher. Accordingly, it was thought that there is a higher risk in terms of pregnant sheep care, delivery management, and lamb care on large farms. Dwyer (2008) also reported that good care and management for pregnant animals improves the health and welfare of sheep, and lambs born in poor conditions may have increased stress reactivity later in life. Again, it showed that using methods such as artificial lamb feeding or involuntary breastfeeding to care for orphaned lambs in large-scale farms with multiple births can cause a conflict of rejection or acceptance between lamb and ewe. Dwyer (2008) reported that managerial actions such as painful procedures without analgesics or disruption of the sheep-lamb bond by permanent or temporary separation could be a source of poor welfare for the newborn lamb.

The results obtained in the study demonstrate that Pırlak farms are traditional operations with low income and low investment. These family-type farms can offer potential opportunities for regional rural development policies. Because the Pırlak sheep breed is a hardy domestic breed that has been adapted to this region for decades, it has the potential to provide high economic income under better care and management. It has been detected that no efforts have been carried out on animal improvement or farmer training in these Pırlak enterprises in Emirdağ. Indeed, in the Emirdağ district, within the scope of the "Community based animal improvement project of Ramlıç Sheep" conducted by the General Directorate of Agricultural Research and Policies, an important increase has been reached in fertility and litter size. Also, the livability, birth weight, weaning weight, and daily body weight gain of Ramlıç lambs were increased within this project's scope (Tekerli et al. 2021). Similarly, if Pırlak sheep are included in the scope of the Community based animal improvement program, it is thought that significant increases in the yields of the Pırlak sheep breed can be achieved, and the quality of animal management can be improved.

CONCLUSION

As a result, the feed production capacity, barn size, window area, lamp number, herd dog number, litter and manure removal frequencies, lamb production, penning ewes with their lambs, and marketing of dairy products were significantly affected by the farm scale. However, the farm scale did not affect the other examined parameters regarding housing, feeding, breeding, animal care, and animal health and welfare. The results obtained in the study indicated that Pırlak farms in Emirdağ were traditional farms having low equity capital and income. These family-type farms offer potential opportunities for regional rural development policies and an animal-friendly or traditional food industry. Because the Pırlak sheep breed is a hardy domestic breed that has been adapted to this region for decades, the improvement efforts to be carried out on the Pırlak sheep can increase the performance of this breed. In conclusion, it has been concluded that the farm management capacities of Pırlak Farms in the Emirdağ should be supported with more public financial incentives and farmers' training in sheep breeding, animal health and welfare, and business economics.

Project Support Information: This study was supported by Afyon Kocatepe University Scientific Project Research Coordination Unit (BAPK) with project number 16.Kariyer.129.

Ethics Committee Information: Permission was obtained for this study with the number of AKU HADYEK-142-16. In addition, the authors declared that they comply with the Research and Publication Ethics.

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

REFERENCES

- Alcedo MJ, Ito K, Maeda K.** Stockmanship competence and its relation to productivity and economic profitability: The context of backyard goat production in the Philippines. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* 2015; 28(3): 428.
- Babai D, Molnár Z.** Small-scale traditional management of highly species-rich grasslands in the Carpathians. *Agriculture, Ecosystems & Environment.* 2014; (182):123-130.
- Bokkers EAM.** Effects of interactions between humans and domesticated animals. In J. Hassink and M. Van Dijk (Eds.), *Farming for Health*, 2006; (pp. 31–41) Wageningen: Frontis.
- Bozkurt Z, Kılıç İ, Hacan Ö, Lenger FÖ.** The effects of Human-Animal Interactions on Animal Welfare. *Kocatepe Vet J.* 2013; 6(1):41-50.
- Caroprese M, Napolitano F, Mattiello S, Fthenakis, GC, Ribó O, Sevi A.** On-farm welfare monitoring of small ruminants. *Small Ruminant Research.* 2016; 135:20-25.
- Caroprese M.** Sheep housing and welfare. *Small ruminant research.* 2008; 76(1-2):21-25.
- Dwyer CM.** The welfare of the neonatal lamb. *Small Ruminant Research.* 2008; 76(1-2): 31-41.
- Dwyer CM.** Welfare of sheep: providing for welfare in an extensive environment. *Small Rumin. Res.* 2009; 86: 14–21. doi: 10.1016/j.smallrumres.2009.09.010.
- Fedele D, Pizzillo M, Claps S, Morand-Fehr P, Rubino R.** Grazing behaviour and diet selection of goats on native pasture in Southern Italy. *Small Ruminant Res.* 1993; 11:305-322.
- Fourie PJ, Mahlako SR, Van der Westhuizen C.** Assessment of the management practices of emerging sheep production systems in the Eastern Free State: can the extensionist make a difference?. *South African Journal of Agricultural Extension.* 2018; 46(2):57-68.
- Fregonesi JA, Leaver JD.** Behaviour, performance and health indicators of welfare for dairy cows housed in strawyard or cubicle systems. *Livest. Prod. Sci.* 2001; 68:205-216.
- Goddard P.** Welfare assessment in sheep. In *Practice.* 2011; 33(10):508-516.
- Lawson D.** The effects of predators on sheep farming in Natal: an opinion survey. *South African Journal of Wildlife Research-24-month delayed open Access.* 1989; 19(1): 4-10.
- Le Neindre P, Guemene D, Arnould C, Leterrier C, Faure JM, Prunier A, Meunier-Salaün MC.** Space, environmental design and behaviour: Effect of space and environment on animal welfare. In *Global conference on animal welfare: an OIE initiative.* 2004;23-25.
- Liu HW, Cao Y, Zhou DW.** Effects of shade on welfare and meat quality of grazing sheep under high ambient temperature. *Journal of animal science.* 2012; 90(13):4764-4770.
- Middleton BA.** Rediscovering traditional vegetation management in preserves: Trading experiences between cultures and continents. *Biological Conservation,* 2013, 158, 271-279.
- Mthi S, Skenjana A, Fayemi PO.** Characteristics of small-scale sheep production systems in some communal areas of the Eastern Cape Province, South Africa. *International Journal of Livestock Production.* 2017; 8(12):199-206.
- Phillips K, Phythian C, Wright N, Morgan M.** Sheep health, welfare and production planning 2. Assessing nutrition of the ewe in late pregnancy. In *Practice.* 2014; 36(3):133-143.
- Phythian C, Phillips K, Wright N, Morgan M.** Sheep health, welfare and production planning 1. Recording and benchmarking performance indicators of flock health and production. In *Practice,* 2014, 36(2), 85-92.

- Raina V, Sharma N, Khajura S, Kumar K, Choudhary S, Hussain K.** Training needs of dairy farmers. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*. 2017; 10(2): 245.
- Sejian V, Maurya VP, Naqvi SMK, Kumar D, Joshi A.** Effect of induced body condition score differences on physiological response, productive and reproductive performance of Malpura ewes kept in a hot, semi- arid environment. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2010; 94(2): 154-161.
- Sekaran U.** *Research Methods for Business*. John Wiley High Education yayınları. New York, 2003.
- Sevi A, Massa S, Annicchiarico G, Dell'aquila S, Muscio A.** Effect of stocking density on ewes milk yield and incidence of subclinical mastitis. *J Dairy Res*. 1999; 66: 489-499.
- Spigarelli C, Zuliani A, Battini M, Mattiello S, Bovolenta S.** Welfare assessment on pasture: A review on animal-based measures for ruminants. *Animals*. 2020; 10(4): 609.
- Stafford KJ, Gregory NG.** Implications of intensification of pastoral animal production on animal welfare. *New Zealand Veterinary Journal*. 2008; 56(6): 274-280.
- Steen H, Myrsterud A, Austrheim G.** Sheep grazing and rodent populations: evidence of negative interactions from a landscape scale experiment. *Oecologia*, 2005; 143(3): 357-364.
- Tekerli M, Erdoğan M, Çelikeloğlu K.** Halk Elinde Küçükbaş Hayvan Islahı Ülkesel Projesi.Ramlıç Koyunlarının Halk Elinde Islahı. Sürekli Proje Sonuç Raporu 2017-2021. 03RAM2011-01.,2021 Afyonkarahisar.
- Tokur O, Marangoz Ö, Nuhoglu Z, Mushtaq S, Pehlivan A, Yavuz O.** Samsun ve çevresinde evcil hayvanlarda görülen zehirlenme vakalarının sistematik toksikolojik analiz prensipleri çerçevesinde değerlendirilmesi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*. 2021; 92(2): 111-120.
- TUIK (2019).** Türkiye İstatistik Kurumu, Hayvancılık İstatistikleri (<https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=101&locale=tr>, Erişim: 11.10.2019).
- Tuyttens FAM.** The importance of straw for pig and cattle welfare: a review. *Applied animal behaviour science*. 2005; 92(3): 261-282.
- Ural A, Kılıç İ.** *Bilimsel Araştırma Süreci ve SPSS ile Veri Analizi*. Detay Yayıncılık.4. Baskı, 2013; Ankara.
- Wadhvani KN, Modi RJ, Islam MM, Patel YG.** Role of housing in welfare of small ruminants. *Indian J. Anim. Prod. Mgmt*. 2016; Vol, 32(3-4): 130-139.

Investigation of Microbiological Quality Parameters of Packaged and Unpackaged Ice Cream Samples Offered for Sale in Afyonkarahisar

Ulaş ACARÖZ^{1*}, Recep KARA¹, Zeki GÜRLER¹, Ali SOYLU¹, Nurtaç KÜÇÜKBÜĞRÜ¹

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

ABSTRACT

Ice cream is a commonly consumed milk product with a high nutritive value. In this study, microbiological properties of packaged ice cream (40) and unpackaged ice cream (40) samples marketed in Afyonkarahisar were investigated. The results of the study showed that minimum and maximum levels of total mesophilic aerobic bacteria, total psychophilic bacteria, *Enterobacteriaceae*, coliform, coagulase-positive staphylococci, yeast/mould determined as <2.00 and 4.30; <2.00 and 2.48; <2.00 and 3.42; <2.00 and 2.48; <2.00 and 2.60; <2.00 and 3.78 log cfu/g for packaged ice cream samples; 3.20 and 5.96; <2.00 and 2.82; <2.00 and 6.20; <2.00 and 5.68; <2.00 and 5.53; <2.00 and 3.60 log cfu/g for unpackaged ice cream samples. Also, *E. coli* was only found in unpackaged ice cream samples. In addition, none of the ice cream samples was contaminated with *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. In conclusion, microbiological analysis of ice cream samples showed that especially unpackaged ice cream samples contain different levels of *E.coli*, coliform and coagulase-positive staphylococci, which indicates an insufficient hygienic quality. To bring hygienic quality to the desired level, hygienic measures must be followed at all stages of ice cream production.

Keywords: Hygiene, ice cream, microbiology, public health

Afyonkarahisar'da Tüketime Sunulan Ambalajlı ve Ambalajsız Dondurma Örneklerinin Mikrobiyolojik Kalite Parametrelerinin Araştırılması

ÖZ

Dondurma, yaygın olarak tüketilen yüksek besin değerine sahip bir süt ürünüdür. Bu çalışmada Afyonkarahisar'da pazarlanan ambalajlı dondurma (n:40) ve ambalajsız dondurma (n:40) örneklerinin mikrobiyolojik kalitesi değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçları minimum ve maksimum toplam mezofilik aerobik bakteri, toplam psikrofilik bakteri, *Enterobacteriaceae*, koliform, koagülaz pozitif stafilocok, maya/küf düzeylerinin ambalajlı dondurma örnekleri için sırasıyla <2,00 ve 4,30; <2,00 ve 2,48 ; <2,00 ve 3,42; <2,00 ve 2,48; <2,00 ve 2,60; <2,00 ve 3,78 log kob/g olduğunu gösterirken bu değerlerin ambalajsız dondurma örnekleri için 3,20 ve 5,96; <2,00 ve 2,82; <2,00 ve 6,20; <2,00 ve 5,68; <2,00 ve 5,53; <2,00 ve 3,60 olduğunu göstermiştir. Ayrıca, *E. coli*'nin sadece ambalajsız dondurma örneklerinde olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, dondurma örneklerinin hiçbirinin *Salmonella* spp. ve *Listeria* spp. içermediği belirlendi. Sonuç olarak, mikrobiyolojik yönden analiz edilen dondurma örneklerinden özellikle ambalajsız olarak açıkta satılanların değişik düzeylerde *E.coli*, koliform ve koagülaz pozitif stafilocok içermesi hijyenik kalitenin yetersiz olduğuna işaret etmektedir. Hijyenik kalitenin istenen seviyeye getirilebilmesi için dondurma üretiminin tüm aşamalarında hijyenik tedbirlere uyulması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Dondurma, halk sağlığı, hijyen, mikrobiyoloji

To cite this article: Acaröz U, Kara R, Gürler Z, Söylü A, Küçükbüğrü N. Investigation of Microbiological Quality Parameters of Packaged and Unpackaged Ice Cream Samples Offered for Sale in Afyonkarahisar. Kocatepe Vet J. (2023):16(1):70-76

Submission: 31.10.2022 Accepted: 27.02.2023 Published Online: 08.03.2023

ORCID ID; UA: 0000-0002-1533-4519, RK: 0000-0002-9257-7506, ZG: 0000-0002-9037-2945, AS: 0000-0003-3199-782X, NK: 0000-0002-2525-3819

*Corresponding author e-mail: ulasacaroz@aku.edu.tr

GİRİŞ

Türk Gıda Kodeksi Dondurma Tebliğine göre dondurma karışımı, “içerisinde tat ve çeşidine göre, süt ve/veya süt ürünlerini, içme suyu, şeker ve izin verilen katkı maddelerini bulunduran, istenildiğinde salep, yumurta ve/veya yumurta ürünleri, aroma maddeleri ve çeşni maddeleri gibi bileşenleri içeren, henüz dondurulmamış haldeki karışım ürünü”; dondurma ise “bu karışımın pastörizasyon sonrası, tekniğine uygun olarak işlenmesi ve dondurulması ile elde edilen, yumuşak halde ya da sertleştirildikten sonra tüketime sunulan ürünü” ifade etmektedir (Türk Gıda Kodeksi Dondurma Tebliği, 2005). Dondurma kuru maddece zenginleştirilen süte, süt tozu, süt yağı, krema, margarin, kaymak, şeker, meyve suyu, meyve, meyve ezmesi, meyve pulpu, meyve suyu konsantresi, öğütülmüş kakao, çözünebilir kahve, vanilin, vanilya, fındık, tatlı badem, Antep fıstığı, yer fıstığı, aroma maddeleri, çeşni maddeleri ve kıvam artırıcı maddeler gibi bazı katkı maddelerinin eklenmesi ile elde edilen karışımın ilk olarak pastörize edilmesi ya da pişirilmesi daha sonra soğutulmuş dondurulması ile elde edilen bir üründür (Dığrak ve ark. 2000; Coşkun 2005; Badayman 2018). Dondurmanın ilk olarak kim tarafından, nerede ve ne zaman üretildiği tam olarak bilinmemekle beraber bundan 3000 yıl kadar önce Çinlilerin kar ile meyve sularını karıştırarak buzlu bir tatlı yaptıkları bilinmektedir (Dığrak ve Özçelik 1991). Dondurma kolay sindirilebilmesi, enerji vermesi, önemli bir kalsiyum, protein, riboflavin, Vitamin A ve Vitamin D kaynağı olması, tat ve aroması, ferahlatıcı nitelikte olması gibi özelliklerinden dolayı toplum tarafından sevilerek tüketilen bir gıda maddesidir (Coşkun 2005; İşleyici ve ark. 2016). Dondurma sahip olduğu yüksek besin içeriğinden dolayı mikroorganizmaların gelişimi için çok uygun bir ortamdır. Proses gereği ısıl işlemden geçirilen ve mikrobiyal gelişim için uygun olmayan sıcaklıklarda muhafaza edilen bir ürün olması sebebiyle dondurma ilk bakışta mikrobiyolojik açıdan güvenilir kabul edilebilir ancak üretimin çeşitli safhalarında çok sayıda mikroorganizmanın bulaşma ihtimali bulunabilmektedir. Bulaşan mikroorganizmaların dondurmaların muhafaza edildikleri düşük sıcaklık derecelerinde uzun süre canlı kalabildikleri bildirilmiştir (Bostan ve Akın 2002; Güner ve ark. 2004). Yetersiz pastörizasyon, kontamine olmuş katkı maddelerinin kullanılması, ilkel yapım teknolojisi, yetersiz personel hijyeni, kullanılan alet ve ekipmanların hijyen ve sanitasyonunun tam olarak sağlanamaması, kullanılan suyun mikrobiyolojik bakımdan uygun olmaması, çevre şartları ve ambalaj materyalinin uygunsuzluğu,

dağıtım ve satış esnasında uygun şartların sağlanamamasından dolayı mikroorganizmalar dondurmaya bulaşabilmekte ve patojen mikroorganizmaları veya bunların toksinlerini içeren dondurmalar gıda infeksiyon ve intoksikasyonlarına sebep olarak değerli bir besin maddesi olan dondurmayı halk sağlığı açısından riskli bir ürün haline getirmektedir (Erol ve ark. 1998; Bostan ve Akın 2002; Kırdar 2003; Güner ve ark. 2004).

Bu çalışma Afyonkarahisar ilinde tüketime sunulan dondurmaların mikrobiyolojik kalitelerini araştırmak ve tüketime sunulan dondurmaların mikrobiyolojik yönden halk sağlığı açısından risk oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada, Afyonkarahisar ilindeki muhtelif pastane ve marketlerden 2018 Temmuz-Ekim döneminde 40 adet ambalajlı, 40 adet ambalajsız dondurma örneği toplanmıştır. Toplanan dondurma örnekleri soğuk zincirde steril koşullar altında laboratuvara taşınmış ve analize alınmıştır. Toplanan dondurma örneklerinde toplam mezofilik aerobik bakteri (Tretola ve ark. 2017), toplam psikrofilik bakteri (Hilgarth ve ark., 2018), koliform (Delikanlı ve ark. 2014), koagülaz pozitif stafilokok (ISO 6888-1 1999), *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2, 2017), *E.coli* (ISO 16649-2 2001), ve maya/küf (Merla ve ark., 2018) sayısal olarak belirlenirken *Listeria* spp. (Iannetti ve ark 2016), ve *Salmonella* spp. (Febo ve ark. 2019) varlık/yokluk yönünden incelenmiştir. Bu amaçla sayı verilen mikroorganizmalar için her bir dondurma örneğinden 10 gram steril poşetlere alınarak üzerine 90 ml steril peptonlu fizyolojik tuzlu su ilave edilmiş ve takiben stomacherde 2 dakika homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ana homojenizattan steril peptonlu su ile 10⁻⁹ basamağına kadar seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. *Salmonella* spp. ve *Listeria* spp. izolasyonu için zenginleştirme işlemleri 25'er gram numune ile gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda incelenen ambalajlı ve ambalajsız dondurma örneklerinin mikrobiyolojik parametrelerine ait minimum, maksimum ve ortalama değerler Tablo 1’de verilmiştir. Ayrıca, ambalajlı ve ambalajsız dondurma örneklerine ait mikrobiyal kontaminasyon düzeyleri sırasıyla Tablo 2 ve Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Ambalajlı ve ambalajsız dondurma örneklerine ait mikrobiyolojik parametreler (kob/g)
Table 1. Microbiological parameters of packaged and unpackaged ice cream samples (cfu/g)

		Toplam Mesofilik Aerob Bakteri	Toplam Psikrofilik Bakteri	Enterobacteriaceae	Koliform	<i>E. coli</i>	Koagulaz (+) Stafilokok	Maya/Küf
Ambalajsız Dondurma n:40	Min.	3,20	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00
	Maks.	5,96	2,82	6,20	5,68	5,34	5,53	3,60
	Ort.	4,96	0,72	3,30	3,23	2,46	1,90	0,94
Ambalajlı Dondurma n:40	Min.	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00
	Maks.	4,30	2,48	3,42	2,48	<2,00	2,60	3,78
	Ort.	2,64	0,32	0,14	0,12	0,00	0,75	0,81

Tablo 2. Ambalajsız satılan dondurma örneklerinin mikrobiyal kontaminasyon düzeyleri (n:40)
Table 2. Microbial contamination levels of unpackaged ice cream samples (n:40)

	Toplam Mezofilik Aerob Bakteri n (%)	Toplam Psikrofilik Bakteri n (%)	Enterobacteriaceae n (%)	Koliform n (%)	<i>E. coli</i> n (%)	Koagulaz (+) Stafilokok n (%)	Maya-Küf n (%)
<log _{2,00}	-	29 (72,5)	10 (25,0)	11 (27,5)	14 (35,0)	22 (55,0)	26 (65,0)
log _{2,00} - ≤3,00	-	11 (27,5)	2 (5,0)	1 (2,5)	3 (7,5)	1 (2,5)	11 (27,5)
log _{3,00} - ≤4,00	3 (7,5)	-	7 (17,5)	7 (17,5)	14 (35,0)	5 (12,5)	3 (7,5)
log _{4,00} - ≤5,00	16 (40,0)	-	16 (40,0)	16 (40,0)	8 (20,0)	9 (22,5)	-
log _{5,00} - ≤6,00	21 (52,5)	-	5 (12,5)	5 (12,5)	1 (2,5)	3 (7,5)	-

Tablo 3. Ambalajlı satılan dondurma örneklerinin mikrobiyal kontaminasyon düzeyleri (n:40)

Table 3. Microbial contamination levels of packaged ice cream samples (n:40)

	Toplam Mezofilik Aerob Bakteri n (%)	Toplam Psikrofilik Bakteri n (%)	Enterobacteriaceae n (%)	Koliform n (%)	<i>E. coli</i> n (%)	Koagülaz(+) Stafilokok n (%)	Maya-Küf n (%)
<log ₂ ,00	4 (10)	38 (95,0)	37 (97,5)	38 (95,0)	40 (100)	28 (70,0)	28 (70,0)
log 2,00 - ≤3,00	28 (70)	2 (5,0)	3 (7,5)	2 (5,0)	-	12 (30,0)	11 (27,5)
log 3,00 - ≤4,00	5 (12,5)	-	-	-	-	-	1 (2,5)
log 4,00 - ≤5,00	3 (7,5)	-	-	-	-	-	-
log 5,00 - ≤6,00	-	-	-	-	-	-	-

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışma sonuçlarımıza göre, toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayısı ambalajsız dondurmalarda 3,20-5,96 log kob/g arasında saptanmıştır. Aydın'da gerçekleştirilen 50 adet ambalajsız dondurma numunesinin analiz edildiği bir çalışmada dondurma örneklerinin TMAB sayısı ortalama 5,16 log kob/g olarak belirlenirken (Badayman 2018); Bursa'da gerçekleştirilen bir çalışmada 48 adet ambalajsız dondurma örneğinin TMAB düzeylerinin $8,1 \times 10^1$ – $1,0 \times 10^6$ kob/g arasında bulunduğu (Çağlayanlar ve ark. 2009); Kars'ta 50 adet ambalajsız dondurma örneğinin incelendiği bir çalışmada TMAB sayılarının ortalama $4,0 \times 10^7$ kob/g olduğu (Aksoy ve ark. 2013); Van'da yapılan bir çalışmada ambalajsız dondurma örneklerinin TMAB sayısının $4,70 \pm 0,27$ log kob/g olarak bulunduğu (İşleyici ve ark. 2016); Konya'da yapılan bir çalışmada 109 adet ambalajsız dondurma örneğinin ortalama TMAB sayısının $9,8 \times 10^5$ – $2,5 \times 10^7$ kob/g arasında tespit edildiği (Güner ve ark. 2004); Erzurum'da yapılan bir çalışmada ise 75 adet ambalajsız dondurma örneğinin ortalama TMAB sayılarının vanilyalı dondurmalarda $4,45 \pm 0,23$ log kob/g, kakao lu dondurmalarda $4,96 \pm 0,22$ log kob/g, vişneli dondurmalarda $4,40 \pm 0,27$ log kob/g olarak belirlendiği bildirilmiştir (Çubukçı ve Aydemir Atasever, 2018). TMAB düzeyi ambalajlı dondurmalarda $<2,00$ – $4,30$ log kob/g arasında belirlenmiştir. Bursa'da gerçekleştirilen çalışmada 44 adet ambalajlı dondurma örneğinin TMAB düzeyi $2,7 \times 10^1$ – $6,9 \times 10^2$ kob/g arasında saptanırken (Çağlayanlar ve ark. 2009); İstanbul'da yapılan bir çalışmada 300 adet ambalajlı dondurma örneğinin ortalama TMAB sayısının $8,8 \times 10^2$ – $2,5 \times 10^3$ kob/g olarak bulunduğu (Bostan ve Akın 2002); Van'da yapılan çalışmada ambalajlı dondurma örneklerinin toplam aerobik mezofilik mikroorganizma sayısının $2,46 \pm 0,16$ log kob/g olarak bulunduğu bildirilmiştir (İşleyici ve ark. 2016).

Toplam psikrofilik Bakteri (TPB) sayısı ambalajsız dondurmalarda $<2,00$ – $2,82$ log kob/g arasında saptanmıştır. Van'da gerçekleştirilen 50 adet dondurma numunesinin analiz edildiği bir çalışmada ambalajsız dondurma örneklerinde TPB sayısı $1,62 \pm 0,33$ log kob/g olarak belirlenirken (İşleyici ve ark. 2016); Ankara'da pastanelerden temin edilen 30 adet dondurma örneğinin incelendiği çalışmada TPB miktarının $1,5 \times 10^2$ – $3,0 \times 10^4$ adet/ml değerinde bulunduğu (Yücel ve Çıtak 2000); Kars'ta 50 adet ambalajsız dondurma örneğinin analizi sonucunda TPB sayısının ortalama $2,0 \times 10^5$ kob/g olarak belirlendiği bildirilmiştir (Aksoy ve ark. 2013). TPB düzeyi ambalajlı dondurmalarda $<2,00$ – $2,48$ log kob/g arasında saptanmıştır. Van'da gerçekleştirilen 50 adet dondurma numunesinin analiz edildiği çalışmada ambalajlı dondurmalarda TPB düzeyi $1,28 \pm 0,24$ log kob/g olarak belirlenirken (İşleyici ve ark. 2016);

Afyonkarahisar'da yapılan bir çalışmada 50 adet ambalajlı dondurma numunesinin TPB sayısı <10 – $2,9 \times 10^6$ log kob/g ortalama da 4×10^5 log kob/g olarak belirlenmiştir (Akarca ve Kuyucuoğlu 2008).

Koagülaz pozitif stafilocok sayısı ambalajsız dondurmalarda $<2,00$ – $5,53$ log kob/g, ambalajlı dondurmalarda $<2,00$ – $2,60$ log kob/g olarak belirlenmiştir. Ankara'da pastanelerden temin edilen 100 adet dondurma numunesi üzerinde yapılan çalışmada numunelerin %20–30,8'inde 10^2 – 10^4 kob/g düzeyinde koagülaz pozitif stafilocok sayısına rastlanırken (Erol ve ark. 1998); Van'da 75 adet ambalajsız dondurma örneğinin analiz edildiği bir çalışmada örneklerin %13,3'ünün koagülaz (+) *Staphylococcus aureus* yönünden kontamine bulunduğu (Ağaoğlu ve Alemdar 2004); Mısır'ın İskenderiye şehrinde 50 adet ambalajlı, 50 adet ambalajsız dondurma numunesinin analiz edildiği bir çalışmada *S. aureus* sayısının ambalajlı dondurmalarda $9,1 \times 10^2 \pm 2,6 \times 10^2$ kob/ml, ambalajsız dondurmalarda $0,8 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$ kob/ml düzeyinde saptandığı (El-Makarem 2017); Burdur'da 50 adet ambalajsız dondurma örneğinin analiz edildiği bir çalışmada *S. aureus* seviyesinin 3.00 log kob/g, *Micrococcus/Staphylococcus* miktarının 3.78 log kob/g olarak belirlendiği (Tasci ve ark. 2011); Kars'ta 50 adet ambalajsız dondurma örneğinin analiz edildiği çalışmada ise dondurma örneklerinin hiçbirinde *S. aureus* tespit edilmediği bildirilmiştir (Aksoy ve ark. 2013).

Toplam maya ve küf sayıları ambalajsız dondurmalarda $<2,00$ – $3,60$ log kob/g arasında, ambalajlı dondurmalarda $<2,00$ – $3,78$ log kob/g arasında saptanmıştır. Van'da 50 adet dondurma örneğinin analiz edildiği çalışmada maya ve küf sayılarının ambalajsız dondurma örneklerinde $2,06 \pm 0,26$ log kob/g, ambalajlı dondurma örneklerinde $0,25 \pm 0,11$ log kob/g olarak belirlendiği (İşleyici ve ark. 2016); Kars'ta 73 adet ambalajsız dondurma örneğinin analiz edildiği bir çalışmada toplam maya ve küf miktarlarının 10^2 – 10^4 kob/g arasında değiştiği (Yaman ve ark. 2006); Bursa'da 44 adet ambalajlı, 48 adet ambalajsız dondurma örneğinin analiz edildiği bir çalışmada ambalajlı dondurma örneklerinin maya miktarının <10 – $1,0 \times 10^1$, küf miktarının <10 – $2,0 \times 10^1$ kob/g arasında, ambalajsız dondurma örneklerinin maya miktarının <10 – $1,5 \times 10^5$, küf miktarının <10 – $1,2 \times 10^3$ kob/g arasında değiştiği bildirilmiştir (Çağlayanlar ve ark. 2009).

Enterobacteriaceae sayısı ambalajsız dondurmalarda $<2,00$ – $6,20$ log kob/g arasında, ambalajlı dondurmalarda $<2,00$ – $3,42$ log kob/g arasında tespit edilmiştir. Aydın'da gerçekleştirilen 50 adet ambalajsız dondurma numunesinin analiz edildiği çalışmada dondurma örneklerinin *Enterobacteriaceae* sayısı ortalama 3,56 log kob/g olarak belirlenirken (Badayman 2018); Erzurum'da yapılan çalışmada 75 adet ambalajsız dondurma örneğinin ortalama

Enterobacteriaceae sayılarının vanilyalı dondurmalarda $2,54 \pm 0,33$ log kob/g, kakaolu dondurmalarda $2,52 \pm 0,29$ log kob/g, vişneli dondurmalarda $2,27 \pm 0,28$ log kob/g olarak belirlendiği bildirilmiştir (Çubukçı ve Aydemir Atasever 2018).

Koliform grubu bakteri sayısı ambalajsız dondurmalarda $<2,00-5,68$ log kob/g arasında, ambalajlı dondurmalarda $<2,00-2,48$ log kob/g arasında tespit edilmiştir. Aydın'da gerçekleştirilen 50 adet ambalajsız dondurma numunesinin analiz edildiği çalışmada dondurma örneklerinin Koliform grubu bakteri sayısı ortalama $3,42$ log kob/g olarak belirlenirken (Badayman 2018); Afyonkarahisar'da yapılan çalışmada 10 adet ambalajlı dondurma numunesinin koliform grubu bakteri sayısının <10 kob/g olarak belirlendiği (Akarca ve Kuyucuoğlu 2008); Isparta'da dondurma üretimi yapan 30 adet pastaneden alınan dondurma örneğinin ortalama koliform bakteri sayısının $2,6 \times 10^2$ kob/g olarak saptandığı (Sağdıç ve ark. 2002); Kars'ta 50 adet ambalajsız dondurma örneğinin incelendiği çalışmada Koliform bakteri sayısının $1,4 \times 10^3$ kob/g olarak belirlendiği (Aksoy ve ark. 2013); Elazığ'da 100 adet ambalajsız dondurma örneğinin incelendiği bir çalışmada ise Koliform bakterilerinin örneklerde en az $<1,00$ log kob/g, en çok $5,74$ log kob/g sayılarında bulunduğu bildirilmiştir (Patır ve ark. 2006).

E.coli düzeyi ambalajsız dondurmalarda $<2,00-5,34$ log kob/g arasında tespit edilirken ambalajlı dondurmalarda *E.coli* varlığına rastlanmamıştır. Kars'ta 50 adet ambalajsız dondurma örneğinin incelendiği çalışmada yalnızca bir örnekte *E.coli*'nin tespit edildiği (Aksoy ve ark. 2013); Isparta'da dondurma üretimi yapan 30 adet pastaneden alınan dondurma örneğinin yalnızca bir adetinde *E. coli* varlığının saptandığı (Sağdıç ve ark. 2002); Van'da 50 adet dondurma numunesinin analiz edildiği bir çalışmada ambalajlı dondurma örneklerinde *E. coli* izole edilemediği, ambalajsız dondurma örneklerinde *E. coli* sayısının <2 log kob/g ile $1,70$ log kob/g arasında değiştiği ve ortalama $0,11 \pm 0,08$ log kob/g olarak bulunduğu (İşleyici ve ark. 2016); Ankara'da pastanelerden temin edilen 100 adet dondurma örneği üzerinde yapılan çalışmada meyveli örneklerin hiç birinde *E. coli*'ye rastlanılmazken, vanilyalı dondurma örneklerinden birinde $2,0$ MPN/g ve çikolatalı dondurma örneklerinden birinde $0,36$ MPN/g seviyesinde *E. coli* saptandığı (Erol ve ark. 1998); Erzurum'da 75 adet ambalajsız dondurma örneğinin analiz edildiği çalışmada *E. coli*'ye rastlanmadığı (Çubukçı ve Aydemir Atasever 2018); İstanbul'da 300 adet ambalajlı dondurma örneğinin analiz edildiği çalışmada incelenen dondurmaların hiçbirinde *E. coli*'ye rastlanmadığı bildirilmiştir (Bostan ve Akın 2002).

Salmonella spp. ve *Listeria* spp. varlığı ambalajlı ve ambalajsız dondurma örneklerinin hiçbirinde saptanamamıştır. Benzer şekilde, Aksoy ve ark. (2013) 50 dondurma örneğinin hiçbirinde *Salmonella* spp. saptamadıklarını bildirmişlerdir. İşleyici ve ark. (2016)

50 dondurma örneğinin hiçbirinde *Salmonella* spp. saptamadıklarını bildirirken 5 dondurma örneğinde *L. monocytogenes* saptadıklarını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, mikrobiyolojik yönden analiz edilen ambalajlı ve ambalajsız dondurma örneklerinden ambalajsız olarak açıkta satılanların Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nde belirlenen limitleri *Enterobacteriaceae* yönünden aştığı saptanmıştır. Bununla birlikte *E.coli*, Koliform ve Koagülaz (+) Stafillokok saptanması hijyenik kalitenin yetersiz olduğuna işaret etmektedir. Bu durumda açık dondurma satışında gerekli hijyenik tedbirlerin alınması, personelin eğitilmesi ve tüketicilerin bilgilendirilmesi önerilmektedir.

Sunum Bilgileri: Bu çalışma özet bildiri olarak Uluslararası Bilim ve Akademi Kongresi-INSAC 2018, Konya, Türkiye' de sunulmuştur.

Etik Kurul Bilgileri: Bu çalışma "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 8 (k) gereği HADYEK iznine tabi değildir.

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

Yazarların Katkı Oranları: UA:%30, RK:%25, ZG:%20, AS: %15, NK: %10

KAYNAKLAR

- Ağaoğlu S, Alemdar S. Van'da Tüketime Sunulan Dondurmalarda Bazı Patojenlerin Varlığının Araştırılması. YYÜ Vet Fak Derg., 2004; 15(1-2), 59-64.
- Akarca G, Kuyucuoğlu Y. Afyonkarahisar'da Satılan Dondurmaların Mikrobiyolojik Kalitesi Üzerine Çalışmalar. Kocatepe Vet. J., 2008; 1, 11-17.
- Aksoy A, Sezer Ç, Vatanser L. Kars Piyasasında Tüketime Sunulan Sade Dondurmaların Mikrobiyolojik Kalitelerinin Belirlenmesi. Harran Üniv Vet Fak Derg., 2013; 2(1), 1-5.
- Badayman M. Aydın İlinde Açıkta Satışa Sunulan Sade Roma Dondurmalarında Hijyen ve Kimyasal Kalitenin Belirlenmesi. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2018.
- Bostan K, Akın B. Endüstriyel Dondurmaların Mikrobiyolojik Kalitesi Üzerine Bir Araştırma. Turk J Vet Anim Sci., 2002; 26(3), 623-629.
- Çağlayanlar GE, Kunduhoğlu B, Çoksöyler N. Comparison of the Microbiological Quality of Packed and Unpacked Ice Creams Sold in Bursa, Turkey. Journal of Arts and Sciences, 2009; 12, 93-102.
- Coşkun F. Tekirdağ İlinde Satılan Sade ve Çilekli Dondurmalarda Fekal Kontaminasyonun Belirlenmesi. Jotaf., 2005; 2(2), 135-142.

- Çubukçu S, Aydemir Atasever M.** Erzurum Piyasasında Tüketime Sunulan Dondurmaların Mikrobiyolojik Kalitesi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 2018; 13(1), 54–62.
- Delikanlı B, Sönmez B, Özdemir Y.** Bursa Merkezinde Tüketime Sunulan Etsiz Çiğ Köftelerin Mikrobiyolojik Kalitesi. *Harran Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.*, 2014; 3, 13–17.
- Dığrak M, Özçelik S.** Elazığ'da Tüketime Sunulan Dondurmaların Mikrobiyolojik Kalitesi. *Gıda /The Journal of Food.*, 1991; 16(3), 195–200.
- Dığrak M, Tanış H, Bağcı E, Kırbag S.** Kahramanmaraş'ta Tüketime Sunulan Dondurumlarda *Listeria*, *Salmonella*, *E.coli* ve *K. Pneumoniae*'nin araştırılması. *Gıda /The Journal of Food.*, 2000; 25(5), 349–353.
- Febio T Di, Schirone M, Visciano P, Portanti O, Armillotta G, Persiani T, Giannatale E Di, Tittarelli M, Luciani M.** Development of a Capture ELISA for Rapid Detection of *Salmonella enterica* in Food Samples. *Food Anal. Methods*, 2019; 12, 322–330.
- El-Makarem AHS.** Microbial Quality of Street-vended Ice cream. *JVMR.*, 2017; 24(1), 147-155.
- Erol İ, Küplülü Ö, Sırken B, Çelik TH.** Ankara'daki Çeşitli Pastanelere Ait Dondurmaların Mikrobiyolojik Kalitelerinin Belirlenmesi. *Türk J Vet Anim Sci.* 1998, 22, 345–352.
- Güner A, Ardiç M, Keleş A.** Konya'da Pastahanelerde Tüketime Sunulan Dondurmaların Mikrobiyolojik Kalitesi. *Vet. Bil. Derg.*, 2004; 20(2), 59–64.
- Hilgarth M, Behr J, Vogel RF.** Monitoring of spoilage-associated microbiota on modified atmosphere packaged beef and differentiation of psychrophilic and psychrotrophic strains. *J. Appl. Microbiol.*, 2018; 124, 740–753.
- ISO-2017.** (International Standart Organisation ISO 21528-2) Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae — Part 2: Colony-count technique.
- ISO-1999.** International Standart Organisation (ISO 6888-1) Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci. Technique using Baird-Parker Agar Medium.
- ISO-2001.** International Standart Organisation (ISO 16649-2) Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase- positive *Escherichia coli* . Part 2: Colony-count technique a 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-beta-D-glucuronide 07/2001.
- Iannetti L, Aniela V, Antoci S, Addante N, Bardasi L, Bilei S, Calistri P, Cito F, Cogoni P, Aurelio RD, Decastelli L, Iannetti S, Iannitto G, Maria A, Marino F, Muliari R, Neri D, Perilli M, Pomilio F, Annunziata V, Proroga Y, Angelo G, Sericola M, Torresi M, Migliorati G.** *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Italy: Prevalence of contamination at retail and characterisation of strains from meat products and cheese. *Food Control.*, 2016; 68, 55–61.
- İşleyici Ö, Sancak H, Tuncay RM.** Van İlinde Satışa Sunulan Ambalajlı ve Ambalajsız Dondurmaların Mikrobiyolojik Kalitesi. *Van Vet J.*, 2016; 27(2), 57–67.
- Kırdar S.** Burdur İlinde Satılan Dondurmaların Bazı Nitelikleri Üzerine Araştırmalar. *Gıda /The Journal of Food.*, 2003; 28(2), 175–181.
- Merla C, Andreoli G, Garino C, Vicari N, Tosi G, Guglielminetti ML, Moretti A, Biancardi A, Arlorio M, Fabbi M.** Monitoring of ochratoxin A and ochratoxin-producing fungi in traditional salami manufactured in Northern Italy. *Mycotoxin Res.*, 2018; 34, 107–116.
- Patır B, Ateş Öksüztepe G, İlhak Oİ.** Elazığ'da Tüketime Sunulan Kaymaklı ve Meyve Aromalı Dondurumlarda Koliform Bakterilerin Dağılımı. *Fırat Üniv Sağlık Bil Enst Derg.*, 2006; 20(1), 1–7.
- Sağdıç O, Tülüoğlu DD, Özçelik S, Şimşek B.** Isparta Piyasasında Tüketime Sunulan Dondurmaların Kimyasal ve Mikrobiyolojik Kalitesi. *Atatürk Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Derg.*, 2002; 33(4), 441–446.
- Tasci F, Sahindokuyucu F, Ozturk D.** Detection of *Staphylococcus* species and staphylococcal enterotoxins by ELISA in ice cream and cheese consumed in Burdur Province. *Afr. J. Agric. Res.*, 2011; 6(4), 937–942.
- Tretola M, Rosa AR Di, Tirloni E, Ottoboni M, Giromini C, Leone F, Orto VD, Chiofalo V, Pinotti L, Rosa AR Di, Tirloni E, Ottoboni M, Giromini C, Leone F, Bernardi CEM, Orto VD, Chiofalo V, Former LP, Leone F.** Former food products safety: microbiological quality and computer vision evaluation of packaging remnants contamination. *Food Addit. Contam. Part A*, 2017; 34, 1427–1435.
- Türk Gıda Kodeksi Dondurma Tebliği.** (2005, 13 Ocak) 13/01/2005 tarihli ve 25699 sayılı Resmi Gazete, s. Tebliğ No: 2004/45.
- Yaman H, Elmalı M, Ulukanlı Z, Tuzcu M, Genctav K.** Microbial Quality of Ice cream Sold Openly by Retail Outlets in Turkey. *RevMedVet.*, 2006; 157(10), 457–462.
- Yücel N, Çıtak S.** Dondurma Örneklerinde Bazı Mikroorganizmaların Varlığı Üzerine Bir Araştırma. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2000, 57(3), 165–170.

Differential Diagnostic Value of Serum Procalcitonin and Iron Levels in Diarrheic Neonatal Calves Caused by *Escherichia coli* and Rotavirus

Şükrü DEĞİRMENÇAY^{1*}, M. Sertaç EROĞLU¹, Emre EREN¹

¹Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, 25240, Erzurum, Türkiye

ABSTRACT

The most common enteropathogens causing diarrhea in neonatal calves are *Escherichia coli* (*E. coli*) and rotavirus. Procalcitonin (PCT) is a parameter that has recently become widely used to determine whether infectious diseases are caused by bacteria. Iron is an essential nutrient for almost all bacterial species, and serum iron levels are used as an inflammatory biomarker. Therefore, in this study, we aimed to investigate the differential diagnosis value of serum iron and procalcitonin levels in *E. coli* and rotavirus diarrhea. The material of the study consisted of 30 calves 1-15 days old. Three groups were formed as: *E. coli* (n=10), rotavirus (n=10) and control (n=10). Calves in the *E. coli* group had the highest PCT (P=0.005) and CRP (P=0.003) levels, as well as the lowest Fe (P=0.000) levels. As a result, it was determined that serum Fe levels could be used as an inflammatory marker and PCT levels higher than 50 pg/mL could be used in the differential diagnosis of *E. coli* diarrhea in calves with 100% sensitivity and 100% specificity.

Keywords: Diarrhea, *Escherichia coli*, Iron levels, Procalcitonin, Rotavirus

Escherichia coli ve Rotavirus Kaynaklı İshalli Neonatal Buzağlarda Serum Prokalsitonin ve Demir Düzeylerinin Ayırıcı Tanı Değeri

ÖZ

Yeni doğan buzağlarda ishale neden olan en yaygın patojenler *Escherichia coli* (*E. coli*) ve rotavirüs'tür. Prokalsitonin (PCT), son zamanlarda bulaşıcı hastalıkların etiyolojisinin bakteriyel olup olmadığını belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir parametredir. Demir (Fe) neredeyse tüm bakteri türleri için temel bir besin olup serum Fe düzeyleri yangısal bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Bu yüzden bu çalışmada *E. coli* ve rotavirüs ishallerinde serum Fe ve PCT düzeylerinin ayırıcı tanı değerini araştırmayı amaçladık. Çalışmanın materyalini 1-15 günlük 30 buzağı oluşturdu. Buzağlar *E. coli* (n=10), rotavirüs (n=10) ve kontrol (n=10) grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. En yüksek PCT (P=0.005) ve CRP (P=0.003) değerleri ve en düşük Fe (P=0.000) değerleri *E. coli* grubundaki buzağlarda saptandı. Sonuç olarak, serum Fe düzeylerinin inflamatuvar belirteç olarak kullanılabilmesi ve 50 pg/mL'den yüksek PCT düzeylerinin buzağlarda *E. coli*'ye bağlı ishalin ayırıcı tanısında %100 duyarlılık ve %100 özgüllük ile kullanılabilmesi belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Diyare, *Escherichia coli*, Demir düzeyleri, Prokalsitonin, Rotavirüs

To cite this article: Değirmençay Ş, Eroğlu MS, Eren E. Differential Diagnostic Value of Serum Procalcitonin and Iron Levels in Diarrheic Neonatal Calves Caused by *Escherichia coli* and rotavirus Kocatepe Vet J. (2023):16(1):77-85

Submission: 15.11.2022 Accepted: 27.02.2023 Published Online: 08.03.2023

ORCID ID; ŞD: 0000-0002-3920-6343 MSE: 0000-0003-1061-8421 EE: 0000-0003-3118-7384

*Corresponding author e-mail: s.degirmencay@atauni.edu.tr

INTRODUCTION

Neonatal calves are highly susceptible to bacterial, viral, and parasitic enteritis due to the immaturity of their immune systems and the failure of passive transfer of maternal antibodies (Cho and Yoon 2014). *Escherichia coli* (*E. coli*), rotavirus, coronavirus and *Cryptosporidium parvum* are the four most common enteropathogens causing neonatal calf diarrhea (Meganck et al. 2014). Nonetheless, *E. coli* and rotavirus are the most frequently isolated pathogens in diarrhea, one of the most important causes of calf mortality (Meganck et al. 2014). Pathogenic *E. coli* strains cause diarrhea, immunosuppression, intestinal wall damage, and increased bacterial load (Lofstedt et al. 2019). Furthermore, septicemia, also known as colisepticemia, frequently develops due to bacterial translocation to the bloodstream (Fecteau et al. 2009). Rotavirus is the most well-known pathogen causing acute diarrhea in calves younger than one-month-old (Alfieri et al. 2006, Barrington et al. 2002). Dehydration and rapid fluid loss occur as a result of infection's quick appearance and spread, which severely damages the intestinal lining (Cook et al. 2004).

The rapid diagnosis of pathogens is vital since determining the pathogens will affect the treatment plan and success. As is known, pro-inflammatory cytokines and acute-phase proteins begin to be produced as soon as the pathogens enter the body (Eckersall and Bell 2010). Procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP), serum amyloid A, and haptoglobin are examples of positive acute phase proteins whose concentrations increase in cases of acute inflammation, while albumin and transferrin are examples of negative acute phase proteins whose concentrations decrease (Cecilianani et al. 2002, Petersen et al. 2004). In recent years, PCT, a precursor of the hormone calcitonin, has been widely used in human medicine for the early detection of bacterial diseases. The absence of an increase in PCT in human viral diseases is critical in confirming whether the infections are of viral or bacterial origin (Matur et al. 2017). Baseline PCT serum levels have been reported to increase 10-100-fold in systemic infections caused by bacterial infections (Becker et al. 2010, Carrol et al. 2002, Ruokonen et al. 2002). Furthermore, the amount of increase in PCT levels provides valuable information about the severity of the infection. (Matur et al. 2017).

Serum iron (Fe) levels have been used in both human and veterinary medicine to monitor the inflammatory process and evaluate the systemic response. Serum Fe levels decrease as infection severity increases (Ayoglu et al. 2016). This decrease has been explained as the body's defense mechanism to limit the use of serum Fe by pathogens and tumors (Weinberg and Miklossy 2008). Serum Fe concentration has been evaluated as an inflammatory biomarker in dogs, cats (Neumann 2003), horses (Borges et al. 2007), and cattle (Baydar

and Dabak 2014, Değirmençay et al. 2022, Kirbas et al. 2019, Yurdakul and Aydoğdu 2020). Fe levels are reduced not only in bacterial infections (Borges et al. 2007), but also in viral infections (Değirmençay et al. 2022, Zhao et al. 2020) and non-infectious inflammations (Tsukano et al. 2019).

Serum PCT levels are highly elevated in bacterial infections, and gram-negative bacteria cause an even more significant increase in PCT levels (Zhao et al. 2020). At the same time, gram-negative bacteria require Fe to grow, and lower Fe levels may be a host defense mechanism to limit bacterial growth (Bullen 1981). As a result, we hypothesized that serum PCT levels in calves with *E. coli* would be quite high and Fe levels relatively low when compared to those with rotavirus in this study. Second, we hypothesized that serum PCT and Fe levels could be useful indicators for the differential diagnosis of *E. coli* and rotavirus diarrhea.

MATERIALS and METHODS

This study was carried out in accordance with Atatürk University's approved ethical rules (protocol no. 2022/2, decision number: 38, date: 02/28/2022), and written informed consent was obtained from the owner for each calf.

Animals and Protocol Design

The study material included 30 cattle, 1-15 days old, Simmental and Montofon breeds, and both genders. The diarrheic calves were divided into two groups based on rapid test kit (Rapid BoviD-5 Ag Test Kit; Cat. No: RC1302DD) results: *E. coli* (n=10) and rotavirus (n=10). Calves with normal clinical examination and haematological findings were assigned to a control group (n=10). All calves' rectal temperatures (RT), heart rates (HR), and respiratory rates (RR) were measured and recorded during the clinical examination.

Blood Sampling

Blood samples from all the calves were taken from vena jugularis externa and collected into tubes with EDTA (Vacutainer, K2E 3.6 mg, BD, UK) and gel (Vacutainer, BD, UK) for haematological and biochemical analyses. Blood samples in gel tubes were kept at room temperature before being centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. The obtained serum samples were stored at -80°C until biochemical analysis. The haematological analyses were completed immediately.

Haematological Analyses

White blood cell (WBC), lymphocyte (LYM), monocyte (MON), neutrophil (NEU), eosinophil (EOS), basophil (BAS), red blood cell (RBC), and haemoglobin (HGB) counts, haematocrit (HCT) and platelet (PLT) levels of the cattle were determined by

a haematology analyser (Abacus Junior Vet5, Hungary).

Biochemical Analyses

Serum PCT concentrations were determined by the electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) method using a chemistry analyser (Cobas e801; Roche Diagnostics, Switzerland). CRP serum concentrations were measured using the latex-enhanced immunoturbidimetric assay (Cobas c702; Roche Diagnostics, Switzerland). Serum Fe, blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CREA), total protein (TP), albumin (ALB), and globulin (GLOB) concentrations in serum samples were determined by commercial kits using a biochemistry autoanalyzer (Mindray BS-300 Chemistry Analyser, China).

Statistical Analyses

The SPSS software program (Version 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. The Shapiro-Wilk test was used to determine the variables' normality and the variances' homogeneity. Nonparametric data were evaluated using the Kruskal Wallis H test as median (minimum/maximum). The Spearman correlation test was used to detect the correlation between variables. Receiver operating characteristic (ROC) curve analyses were made using Medcalc version 20 software (Mariakerke, Belgium). The diagnostic values of Fe and PCT were evaluated using ROC curve analysis to determine the diagnostic cut-offs for the best differentiation between bacterial and viral infections. All statistical comparisons were performed at the significance level of $P < 0.05$.

RESULTS

Clinical Findings

The *E. coli* and rotavirus groups had a low temperature and increased respiratory frequency. Calves generally showed varying degrees of diarrhea, dehydration, weakness, appetite loss, and diminished sucking reflex.

Hematological Findings

In the analysis of haematological parameters, calves in the rotavirus group had higher WBC ($P=0.006$), NEU ($P=0.004$), and PLT ($P=0.000$) values than calves in control and *E. coli* groups. The RBC ($P=0.002$), HGB ($P=0.001$), and HCT ($P=0.000$) values of the calves in the rotavirus and *E. coli* groups were higher than those in the control group, consistent with dehydration (Table 1).

Biochemical Findings

When the biochemical parameters of the groups were examined, the Fe levels were found to be low in both patient groups ($P=0.000$). The highest PCT ($P=0.000$) and CRP ($P=0.003$) values and the lowest Fe ($P=0.000$) values were determined in calves in the *E. coli* group. The BUN ($P=0.000$), CREA ($P=0.001$), TP ($P=0.002$), ALB ($P=0.002$), and GLOB ($P=0.035$) values were significantly higher in the patient groups than in the control group (Table 1).

All groups' correlation results showed that serum PCT levels were strongly negatively correlated with Fe levels ($r=-0.663$, $p=0.000$). Serum Fe levels were moderately negatively correlated with NEU ($r=-0.422$, $p=0.020$), while it was weakly negatively correlated with CRP ($r=-0.384$, $p=0.036$) (Table 2). HCT levels were strongly positively correlated with BUN ($r=0.716$, $p=0.000$) and CREA levels ($r=0.644$, $p=0.000$).

Serum PCT and Fe were shown to have a strong negative correlation ($r=-0.802$, $p=0.000$) based on the correlation results between the *E. coli* and control groups. The correlation between PCT and CRP ($r=0.569$, $p=0.009$) and NEU ($r=0.577$, $p=0.008$) was moderately positive. Fe and CRP showed a strong negative correlation ($r=-0.612$, $p=0.004$) (Table 3).

The correlation results between the rotavirus and control groups revealed a highly negative correlation between serum Fe and WBC ($r=-0.771$, $p=0.000$) and NEU ($r=-0.746$, $p=0.000$). A moderate negative correlation between PCT and Fe was found in the correlation analysis between *E. coli* and rotavirus groups ($r=-0.516$, $p=0.020$).

ROC analysis results of Fe, PCT, and CRP between control and *E. coli* groups are shown in Table 4 and Figure 1. The areas under the ROC curves (AUC) were 1.000 for the Fe and PCT and 0.925 for the CRP parameter. The cut-off values of Fe and PCT parameters for showing bacterial infection were ≤ 56.59 $\mu\text{g/dL}$, and > 50 pg/mL , respectively. The sensitivity and specificity values of the proposed diagnostic cut-off point for demonstrating bacterial infection were 100% and 100% for Fe and PCT.

ROC analysis results of Fe, PCT, and CRP between control and rotavirus groups are shown in Table 5 and Figure 2. The areas under the ROC curves (AUC) were 1.000 for the Fe, 0.560 for the PCT, and 0.820 for the CRP parameter. The cut-off values of Fe and PCT parameters for showing viral infection were ≤ 89 $\mu\text{g/dL}$, and > 40 pg/mL , respectively. The proposed diagnostic cut-off points for demonstrating viral infection had sensitivity and specificity values of 100% and 100% for Fe and 30% and 90% for PCT, respectively.

Table 1. Comparison of haematological, biochemical and some clinical parameters of calves in control, *E. coli* and

Parameters	Control group (n:10)	<i>E. coli</i> group (n:10)	Rotavirus group (n:10)	P value
WBC (x10³/μL)	8.645 ^A (7.65-9.83)	10.21 ^{AB} (5.23-29.8)	17.05^B (11.28-26.68)	0.006
LYM (x10 ³ /μL)	4.68 ^A (3.08-5.83)	3.605 ^A (2.37-7.38)	4.86 ^A (2.75-10.56)	0.117
MON (x10 ³ /μL)	0.215 ^A (0.12-0.42)	0.11 ^B (0.04-0.54)	0.195 ^A (0.1-1.48)	0.036
NEU (x10³/μL)	3.665 ^A (2.57-5.3)	7.465 ^{AB} (0.06-23.59)	11.13^B (7.77-20.71)	0.004
EOS (x10 ³ /μL)	0.035 ^A (0.01-0.05)	0.02 ^A (0-0.1)	0.03 ^A (0.01-0.12)	0.543
BAS (x10 ³ /μL)	0 ^A (0-0)	0.01 ^B (0-0.05)	0.03 ^C (0.01-0.16)	0.000
RBC (x10⁶/μL)	8.225 ^A (7.33-8.9)	9.475^B (8.11-13.56)	10.445^B (7.94-13.99)	0.002
HGB (g/dL)	9.5 ^A (9.1-9.7)	11.45^B (9.8-15.9)	13.85^B (9-16.9)	0.001
HCT (%)	26.36 ^A (24.48-27.88)	38.775^B (33-56.75)	45.165^B (30.38-53.14)	0.000
PLT (x10³/μL)	369.5 ^A (277-443)	319.5 ^A (261-520)	627.5^B (453-769)	0.000
Fe (μg/dL)	151.7 ^A (96.6-297.1)	21.44^B (10.95-56.59)	41.99^B (7.71-89)	0.000
PCT (pg/mL)	20 ^A (20-50)	115^B (80-240)	20 ^A (20-54)	0.000
CRP (Mg/L)	0.06 ^A (0-0.07)	0.11^B (0.07-0.18)	0.08 ^B (0.04-0.24)	0.003
BUN (mg/dL)	16 ^A (10-23)	62.36^B (4.87-172.36)	126.305^B (46.23-151.38)	0.000
Creatinine (mg/dL)	0.76 ^A (0.55-4.62)	3.96^B (1.11-6.45)	2.68^B (1.03-7.03)	0.001
TP (g/dL)	4.85 ^A (4.1-5.6)	6.95^B (4.98-11.27)	7.11^B (1.72-8.71)	0.002
ALB (g/dL)	2.05 ^A (1.74-2.19)	2.65^B (2-3.8)	2.6^B (0.8-3.34)	0.002
GLOB (g/dL)	2.82 ^A (1.9-3.9)	4.35^B (1.9-8.6)	4.07^B (0.9-6.4)	0.035
RT (°C)	38.85 (38.4-39.3)	38.55 (38.1-39.1)	38.15 (36-39.8)	0.324
HR (beats/min)	132 (92-176)	136 (76-160)	118 (58-156)	0.335
RR (breaths/min)	28 (20-72)	36 (28-72)	38 (18-56)	0.112

rotavirus groups

WBC: white blood cell; LYM: lymphocyte; MON: monocyte; NEU: neutrophil; EOS: eosinophil; BAS: basophil; RBC: red blood cell; HGB: haemoglobin; HCT: haematocrit; PLT: platelet; Fe: iron; PCT: procalcitonin; CRP: C-reactive protein; BUN: Blood urea nitrogen; CREA: Creatinine; TP: Total protein; ALB: Albumin; GLOB: Globulin; RT: Rectal temperature; HR: Heart rate (per min); RR: Respiratory rate (per min). Data are presented as median (range). Different letters in the same line are statistically significant (P<0.05).

Table 2. Correlation results between PCT and Fe, CRP, WBC, MON, and NEU levels in diarrheic and healthy calves (Spearman correlation analysis)

Parameters	PCT	Fe	CRP	WBC	MON	NEU
PCT	1.000	-0.663**	0.214	0.103	-0.264	0.253
Fe		1.000	-0.384*	-0.351	-0.135	-0.422*
CRP			1.000	0.052	-0.264	0.101
WBC				1.000	0.219	0.926**
MON					1.000	0.061
NEU						1.000

PCT: procalcitonin; Fe: iron; CRP: C-reactive protein; WBC: white blood cell; MON: monocyte; NEU: neutrophil.
*P <0.05, **P<0.01.

Table 3. Correlation results between PCT and Fe, CRP, WBC, MON, and NEU levels in *E. coli* and control groups (Spearman correlation analysis)

Parameters	PCT	Fe	CRP	WBC	MON	NEU
PCT	1.000	-0.802**	0.569**	0.319	-0.377	0.577**
Fe		1.000	-0.612**	-0.042	0.357	-0.233
CRP			1.000	-0.113	-0.461*	0.025
WBC				1.000	0.143	0.798**
MON					1.000	-0.045
NEU						1.000

PCT: procalcitonin; Fe: iron; CRP: C-reactive protein; WBC: white blood cell; MON: monocyte; NEU: neutrophil.
*P <0.05, **P<0.01.

Table 4. Receiver operating characteristic (ROC) results of Fe, PCT and CRP between control and *E. coli* groups (n=20)

Parameters	Fe ($\mu\text{g/dL}$)	PCT (pg/mL)	CRP (Mg/L)
Area	1.000	1.000	0.925
Cut-off	≤ 56.59	> 50	> 0.07
Sensitivity (%)	100	100	70
Specificity (%)	100	100	100
SEM	0.000	0.000	0.0456
P value	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Fe: iron; PCT: procalcitonin; CRP: C-reactive protein

Table 5. Receiver operating characteristic (ROC) results of Fe, PCT and CRP between control and rotavirus groups (n=20)

Parameters	Fe ($\mu\text{g/dL}$)	PCT (pg/ml)	CRP (Mg/L)
Area	1.000	0.560	0.820
Cut-off	≤ 89	> 40	> 0.07
Sensitivity (%)	100	30	50
Specificity (%)	100	90	100
SEM	0.000	0.103	0.0896
P value	< 0.001	0.559	< 0.001

Fe: iron; PCT: procalcitonin; CRP: C-reactive protein

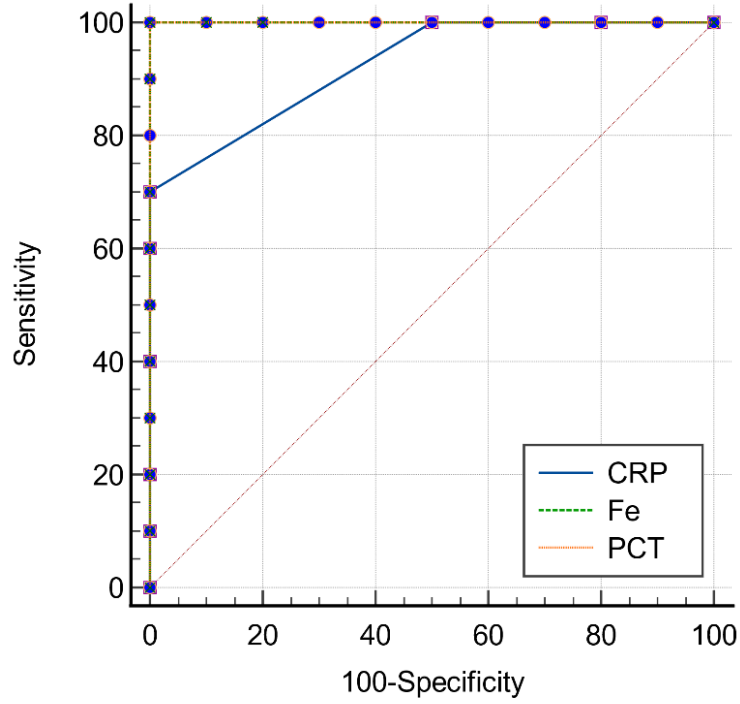


Figure 1. ROC curve analysis of Fe, PCT and CRP between control and *E. coli* groups

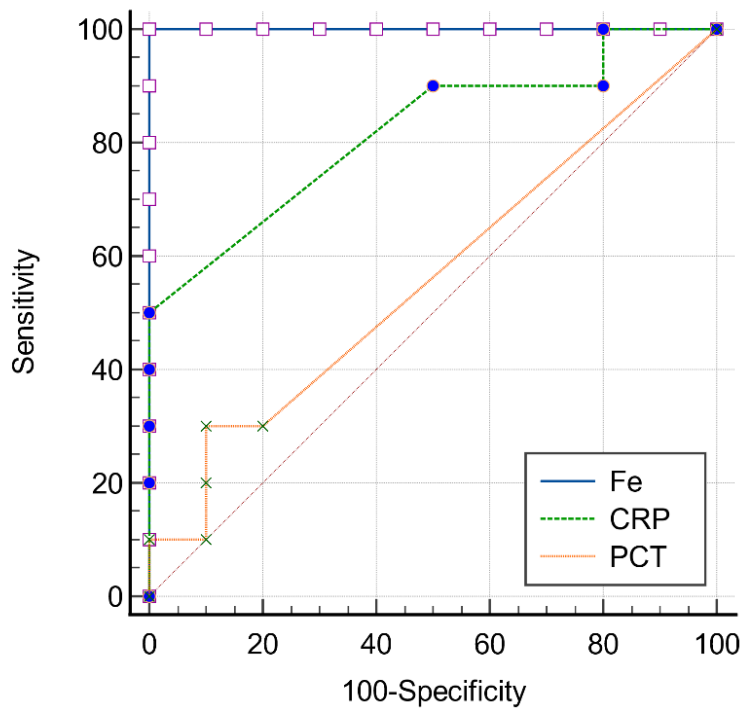


Figure 2. ROC curve analysis of Fe, PCT and CRP between control and rotavirus groups

DISCUSSION

In this study, we investigated the utility of serum PCT and Fe levels in the differential diagnosis of calves with diarrhea due to *E. coli* and rotavirus. Consistent with our hypothesis, the *E. coli* group had the highest PCT and lowest Fe levels in calves. We also suggested that PCT levels >50 pg/mL and Fe levels less than ≤56.59 µg/dL could be used with 100% sensitivity and 100% specificity in the differential diagnosis of *E. coli* diarrhea in calves.

It has been reported that PCT concentrations in neonatal calves with septicemic colibacillosis are approximately four times higher than in the control group. There is a positive correlation between PCT and proinflammatory cytokines. As a result, PCT has been suggested as a useful marker of septicemic colibacillosis in neonatal calves (Ercan et al. 2016). Similarly, very high PCT levels were found in dogs given endotoxin (Easley et al. 2020), horses with SIRS (Bonelli et al. 2015), and horses with colic with endotoxemia (Teschner et al. 2015). In our study, PCT levels in the *E. coli* group were five times higher than in the control group. In ROC analysis, the diagnostic cut-off value of PCT levels was found to be >50 pg/mL with 100% sensitivity and specificity for bacterial infection. Therefore, our results suggest that PCT could be used as a potential diagnostic marker of *E. coli* diarrhea in calves.

Procalcitonin has been shown to be elevated in bacterial infections but remained low in viral infections (Gendrel et al. 1999, Simon et al. 2004). Similar to this, we noticed that PCT levels in the rotavirus group were the same as in the control group and did not rise. Bacterial endotoxins are the primary trigger for PCT induction (Easley et al. 2020, Lippi and Cervellin 2018). As is well known, Enterotoxigenic *E. coli* (K99 - ETEC) is the predominant strain that causes neonatal calf diarrhea. They produce infectious diarrhea by directly attaching to enterocytes in the intestinal mucosa or by inducing inflammation with their toxins or lipopolysaccharides (Foster and Smith 2009). These arguments suggest that our hypothesis regarding elevated PCT levels in the *E. coli* group is rather logical. PCT levels can be used as a potentially effective marker to distinguish *E. coli* diarrhea from rotavirus diarrhea, given that the sensitivity and specificity of PCT in ROC analysis are both 100%.

In severe systemic inflammation or bacterial infections, PCT is noticeably enhanced (up to 5.000-fold) within 2 to 4 hours, and the level lasts until recovery (Gilbert 2010, Pfäfflin and Schleicher 2009). CRP and WBC, two inflammatory biomarkers, are not specific for bacterial infections (Müller et al. 2007). PCT is superior to CRP and other acute phase reactants because of its biological half-life of 22 to 26 hours (Limper et al. 2010). This study found a moderately strong positive correlation between PCT

and CRP, and NEU in the correlation results between the control and *E. coli* groups. Although there was a non-significant increase in CRP and NEU levels in both patient groups, there was a statistically significant PCT elevation in the *E. coli* group. This suggests that PCT levels are a good marker that can be used to distinguish *E. coli* diarrhea from rotavirus diarrhea. Serum PCT levels are reported to decrease after administering the appropriate antibiotic treatments (Assicot et al. 1993). Serum PCT levels can help clinicians decide whether to start or stop antibiotic therapy (Covington et al. 2018, Wolfsberg et al. 2022). We argue that PCT can be used effectively in diagnosing bacterial infections in calf diarrhea and as a marker to guide antibiotic therapy. Serum Fe levels tend to decline as infection severity rises and hence can be used as a marker for inflammation (Baydar and Dabak 2014, Degirmençay et al. 2022, Tsukano et al. 2020). Similarly, in this study, serum Fe levels decreased and negatively correlated with PCT, CRP, and NEU levels. Therefore, serum Fe levels can be used as a marker of inflammation in calves with neonatal diarrhea. The *E. coli* group had the lowest serum Fe levels, yet the rotavirus group also declined. This can be explained by the decrease in serum Fe levels not only in bacterial infections but also in viral and non-infectious inflammation conditions. Decreased Fe levels will diminish the utility of serum Fe levels in the differential diagnosis of viral infections. Nevertheless, based on the findings of our ROC analysis, we can state that Fe levels between 56.59 and 89 µg/dL will be used to diagnose rotavirus diarrhea with 100% sensitivity and 100% specificity. In contrast, Fe levels below 56.59 µg/dL are used to diagnose *E. coli* diarrhea with 100% sensitivity and 100% specificity.

CONCLUSIONS

In conclusion, we investigated the changes in serum PCT and Fe levels in calves with *E. coli* and rotavirus diarrhea, as well as the utility of these markers in differential diagnosis. While serum Fe levels decreased in both patient groups, we found that serum PCT levels increased excessively only in the *E. coli* group. As a result, while serum Fe levels can be used as an inflammation marker, only serum PCT levels can be used in differential diagnosis. Based on the intergroup comparison and ROC analysis, PCT levels greater than 50 pg/mL have 100% sensitivity and 100% specificity in the differential diagnosis of *E. coli* diarrhea in calves.

Ethics Committee Information: This study was carried out in accordance with Atatürk University's approved ethical rules (protocol no. 2022/2, decision number: 38, date: 02/28/2022), and written informed consent was obtained from the owner for each calf. The information, data, and documents presented in

this article were obtained in accordance with academic and ethical rules.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Authors Contribution Rate: ŞD: %70, MSE: %15, EE: %15

Financial support: The study was self-funded.

REFERENCES

- Alfieri AA, Parazzi ME, Takiuchi E, Médici KC, Alfieri AF.** Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Trop. Anim. Health Prod.* 2006;38(7-8): 521-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17265766>
- Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C.** High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet (London, England)* 1993;341(8844): 515-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8094770>
- Ayoglu H, Sezer U, Akin M, Okyay D, Ayoglu F, Can M, Kucukosman G, Piskin O, Aydin B, Cimencan M, Gur A, Turan I.** Selenium, copper, zinc, iron levels and mortality in patients with sepsis and systemic inflammatory response syndrome in Western Black Sea Region, Turkey. *J. Pak. Med. Assoc.* 2016;66(4): 447-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27122274>
- Barrington GM, Gay JM, Evermann JF.** Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2002;18(1): 7-34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12064170>
- Baydar E, Dabak M.** Serum iron as an indicator of acute inflammation in cattle. *J. Dairy Sci.* 2014;97(1): 222-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24268402>
- Becker KL, Snider R, Nysten ES.** Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: a harmful biomarker and a therapeutic target. *Br. J. Pharmacol.* 2010;159(2): 253-64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20002097>
- Bonelli F, Meucci V, Divers TJ, Jose-Cunilleras E, Corazza M, Tognetti R, Guidi G, Intorre L, Sgorbini M.** Plasma Procalcitonin Concentration in Healthy Horses and Horses Affected by Systemic Inflammatory Response Syndrome. *J. Vet. Intern. Med.* 2015;29(6): 1689-91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26474412>
- Borges AS, Divers TJ, Stokol T, Mohammed OH.** Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. *J. Vet. Intern. Med.* 2007;21(3): 489-94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17552456>
- Bullen JJ.** The significance of iron in infection. *Rev. Infect. Dis.* 1981;3(6): 1127-38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7043704>
- Carrol ED, Newland P, Riordan FAI, Thomson APJ, Curtis N, Hart CA.** Procalcitonin as a diagnostic marker of meningococcal disease in children presenting with fever and a rash. *Arch. Dis. Child.* 2002;86(4): 282-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919107>
- Ceciliani F, Giordano A, Spagnolo V.** The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein Pept. Lett.* 2002;9(3): 211-23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12144517>
- Cho Y-I, Yoon K-J.** An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J. Vet. Sci.* 2014;15(1): 1-17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24378583>
- Cook N, Bridger J, Kendall K, Gomara MI, El-Attar L, Gray J.** The zoonotic potential of rotavirus. *J. Infect.* 2004;48(4): 289-302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066329>
- Covington EW, Roberts MZ, Dong J.** Procalcitonin Monitoring as a Guide for Antimicrobial Therapy: A Review of Current Literature. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* 2018;38(5): 569-81. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/phar.2112>
- Değirmençay Ş, Kirbaş A, Aydın H, Aydın Ö, Aktaş MS, Kaman R.** Evaluation of Serum Iron and Ferritin Levels as Inflammatory Markers in Calves with Bovine Respiratory Disease Complex. *Acta Vet. Brno.* 2022;72(1): 59-75. Available from: <https://www.sciendo.com/article/10.2478/acve-2022-0005>
- Easley F, Holowaychuk MK, Lashnits EW, Nordone SK, Marr H, Birkenheuer AJ.** Serum procalcitonin concentrations in dogs with induced endotoxemia. *J. Vet. Intern. Med.* 2020;34(2): 653-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31970837>
- Eckersall PD, Bell R.** Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet. J.* 2010;185(1): 23-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20621712>
- Ercan N, Tuzcu N, Başbug O, Tuzcu M, Alim A.** Diagnostic value of serum procalcitonin, neopterin, and gamma interferon in neonatal calves with septicemic colibacillosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2016;28(2): 180-3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26965240>
- Fecteau G, Smith BP, George LW.** Septicemia and meningitis in the newborn calf. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2009;25(1): 195-208, vii-viii. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19174289>
- Foster DM, Smith GW.** Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2009;25(1): 13-36. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072008000911>
- Gendrel D, Raymond J, Coste J, Moulin F, Lorrot M, Guérin S, Ravilly S, Lefèvre H, Royer C, Lacombe C, Palmer P, Bohuon C.** Comparison of procalcitonin with C-reactive protein, interleukin 6 and interferon-alpha for differentiation of bacterial vs. viral infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1999;18(10): 875-81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10530583>
- Gilbert DN.** Use of plasma procalcitonin levels as an adjunct to clinical microbiology. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(7): 2325-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421436>
- Kirbas A, Kandemir FM, Celebi D, Hanedan B, Timurkan MO.** The use of inflammatory markers as a diagnostic and prognostic approach in neonatal calves with septicemia. *Acta Vet. Hung.* 2019;67(3): 360-76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31549538>
- Limper M, de Kruif MD, Duits AJ, Brandjes DPM, van Gorp ECM.** The diagnostic role of procalcitonin and other biomarkers in discriminating infectious from non-infectious fever. *J. Infect.* 2010;60(6): 409-16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20347867>

- Lippi G, Cervellin G.** Procalcitonin for diagnosing and monitoring bacterial infections: for or against? *Clin. Chem. Lab. Med.* 2018;56(8): 1193–5. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2018-0312/html>
- Lofstedt J, Dohoo IR, Duizer G.** Model to predict septicemia in diarrheic calves. *J. Vet. Intern. Med.* 2019;13(2): 81–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10225596>
- Matur E, Eraslan E, Çötelioglu U.** Biology of procalcitonin and its potential role in veterinary medicine. *J. Istanbul Vet. Sci.* 2017;1(1): 16–27.
- Meganck V, Hoflack G, Opsomer G.** Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. *Acta Vet. Scand.* 2014;56: 75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25431305>
- Müller B, Harbarth S, Stolz D, Bingisser R, Mueller C, Leuppi J, Nusbaumer C, Tamm M, Christ-Crain M.** Diagnostic and prognostic accuracy of clinical and laboratory parameters in community-acquired pneumonia. *BMC Infect. Dis.* 2007;7: 10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17335562>
- Neumann S.** Serum iron level as an indicator for inflammation in dogs and cats. *Comp. Clin. Path.* 2003;12(2): 90–4. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00580-003-0481-3>
- Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH.** Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 2004;35(2): 163–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15099494>
- Pfäfflin A, Schleicher E.** Inflammation markers in point-of-care testing (POCT). *Anal. Bioanal. Chem.* 2009;393(5): 1473–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19104782>
- Ruokonen E, Ilkka L, Niskanen M, Takala J.** Procalcitonin and neopterin as indicators of infection in critically ill patients. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 2002;46(4): 398–404. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11952440>
- Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J.** Serum Procalcitonin and C-Reactive Protein Levels as Markers of Bacterial Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 2004;39(2): 206–17. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/421997>
- Teschner D, Rieger M, Koopmann C, Gehlen H.** Procalcitonin in horses with an acute colic. *Pferdeheilkd. Equine Med.* 2015;31(4): 371–7. Available from: <https://www.pferdeheilkunde.de/10.21836/PEM20150407>
- Tsukano K, Shimamori T, Fukuda T, Nishi Y, Otsuka M, Kitade Y, Suzuki K.** Serum iron concentration as a marker of inflammation in young cows that underwent dehorning operation. *J. Vet. Med. Sci.* 2019;81(4): 626–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30828032>
- Tsukano K, Shimamori T, Suzuki K.** Serum iron concentration in cattle with endotoxaemia. *Acta Vet. Hung.* 2020;68(1): 53–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32384071>
- Weinberg ED, Miklossy J.** Iron withholding: a defense against disease. *J. Alzheimers. Dis.* 2008;13(4): 451–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18487852>
- Wolfsberg S, Gregoriano C, Schuetz P.** Procalcitonin for individualizing antibiotic treatment: an update with a focus on COVID-19. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2022;59(1): 54–65. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408363.2021.1975637>
- Yurdakul İ, Aydoğdu U.** The effects of local and systemic inflammatory status on iron metabolism and lipid profile in calves. *Eurasian J. Vet. Sci.* 2020;36(2): 121–6. Available from: http://eurasianjvetsci.org/pdf/pdf_EJVS_1288.pdf
- Zhao K, Huang J, Dai D, Feng Y, Liu L, Nie S.** Serum Iron Level as a Potential Predictor of Coronavirus Disease 2019 Severity and Mortality: A Retrospective Study. *Open forum Infect. Dis.* 2020;7(7): ofaa250. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32661499>

Geometric Morphometric Analysis of Skull in Honamlı, Hair, Kilis and Saanen Goat Using Dorsal Landmarks

Ahmet YAPRAK^{1*}, Yasin DEMİRASLAN², Özcan ÖZGEL²

¹Edirne Kapıkule Veterinary Border Control Point Directorate, 22100, Edirne, Türkiye

²Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, 15500, Burdur, Türkiye

ABSTRACT

The study aimed was to analyze the dorsal aspect of the skulls of Honamlı, Hair, Kilis, and Saanen goats by the geometric morphometric method. A total of 48 adult goat skulls, 6 male and 6 female, were used for each breed. After the skulls were photographed dorsally, 10 homologous landmarks were marked. As a result of our study, the degree of dorsal separation of the skulls according to sex was found to be limited. Nevertheless, significant separation was seen in the Honamlı skulls of females and in the Honamlı and Saanen skulls of males. This information may serve as a reference for the skull remains of ruminants.

Keywords: Geometric Morphometric, Goat, Landmark, Principal Component Analysis

Honamlı, Kıl, Kilis ve Saanen Keçilerinde Kafatasının Dorsal Landmarklar Kullanarak Geometrik Morfometrik Analizi

ÖZ

Çalışmada geometrik morfometri yöntemi ile Honamlı, Kıl, Kilis ve Saanen keçisine ait kafataslarının dorsal yönden analizi amaçlandı. Her ırk için ayrı ayrı 6 erkek ve 6 dişi olmak üzere toplamda 48 adet ergin keçi kafatası kullanıldı. Kafatasları dorsal yönden fotoğraflandıktan sonra 10 adet homolog landmark işaretlendi. Çalışmamız neticesinde dorsal yönden cinsiyete göre kafataslarının birbirinden ayrılma derecesi sınırlı olarak saptandı. Buna rağmen dişilerde Honamlı kafataslarında, erkeklerde ise Honamlı ve Saanen kafataslarında belirgin ayrılmalar görüldü. Bu bilgilerin geviş getirenlere ait kafatası kalıntıları için referans oluşturabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Geometrik Morfometri, Keçi, Landmark, Temel Bileşenler Analizi

To cite this article: Yaprak A, Demiraslan Y, Ozgel O. Geometric Morphometric Analysis of Skull in Honamlı, Hair, Kilis and Saanen Goat Using Dorsal Landmarks. Kocatepe Vet J. (2023) 16(1):86-92

Submission: 16.12.2022 Accepted: 06.03.2023 Published Online: 10.03.2022

ORCID ID; AY: 0000-0001-7903-9570 YD: 0000-0003-3612-6142 OO: 0000-0003-0394-5678

*Corresponding author e-mail: yaprakahmet3@gmail.com

INTRODUCTION

Domestic goats originate from the wild goat breeds *Capra Prisca*, *Capra Falconeri*, and *Capra Aegagrus* (Şengonca and Koşum 2005, Kaymakçı 2006, Günlü and Alaşahan 2010). Hair goat is a combined productive goat breed that is resistant to harsh climatic and environmental conditions and is the most numerous in Türkiye. (Sengonca and Kosum 2005, Günlü and Alaşahan 2010). Kilis goat is widely cultivated in the Southeastern Anatolia region. These goats are a goat breed with a robust body structure, long walking ability, high milk, and fertility. (Yalçın 1986, Kaymakçı and Aşkın 1997, Sengonca and Koşum 2005, Günlü and Alaşahan 2010). Honamlı goats have been bred pure in the Taurus Mountains for centuries. It was included in the scope of indigenous breeds taken under protection in Türkiye in 2005. (Karadağ and Soysal 2018). Saanen goats are bred in the Saanen valley of Switzerland. It is a goat breed with high fertility and milk yield. (Ceyhan and Karadağ 2009).

To increase the depth of information obtained with traditional morphometrics, a method called geometric morphometrics has emerged (Rohlf and Marcus 1993). In this method, shape differences that cannot be detected visually are detected by landmark (LM) coordinates. LMs, therefore, measure the amount of strain by exploiting differences in position between materials. (Kimmerle et al. 2008, Viscosi and Cardini 2011, Zelditch et al. 2012). In the literature review on goats, it was seen that there was a limited number of geometric morphometric method studies (Haruda 2017, Pares Casanova and Domenech Domenech 2021). The study aimed to analyze the skulls of four different goat breeds by geometric morphometry from the dorsal aspect.

MATERIALS and METHODS

In the study, 6 male and 6 female adult goat skulls were used separately for each breed. Skulls were obtained from meat plants in the regions where the breeds are distributed in Türkiye. Skulls are macerated for ease of processing. The skulls were photographed dorsally from a distance of 30 cm, focusing on the sutura frontonasalis. The obtained photographs were converted to tps files using TpsUtil (Version 1.79). Ten homologous landmarks were marked on the dorsal aspect of the skulls using the TpsDig2 program (Version 2.31). Landmarks marked from dorsal on the skulls of female Hair are shown in Figure 1. A Homologous landmark verification test was performed with TpsSmall (Version 1.34) program (Rohlf 2017). General Procrustes Analysis (superimposition) was performed on the skulls to eliminate variables such as size, position, and orientation (Slice 2005). PAST (Version 4.02)

program was used for this analysis (Hammer et al. 2001).

Principal component analysis (PCA) was performed on the new coordinates obtained as a result of superimposition using the same program. Thus, the degree of separation of the skulls by race was determined (Zelditch et al. 2004). Discriminant function analysis (DFA) was performed with the MorphoJ program to show at which LMs level and in which direction the shape difference is (Klingenberg 2011). In the study, Relative Warp Analysis was performed with the TpsRelw (Version 1.70) program, consensus graphs of the groups were created and the distribution of the groups on the graph was tested with this analysis. (Rohlf 2017). Statistical analysis of LM coordinate values according to groups was performed with the ANOVA test in the PAST (Version 4.02) program.

RESULTS

In the study, PCA-1 explained 50.628% of the total shape variation in females and 42.268% in males. Scatter plots of individuals according to PCA and Relative Warp analysis are shown in Figure 2. The degree of separation between races was limited. The most prominent clusters were observed in the Honamlı skulls of females and the Honamlı and Saanen skulls of males.

The graph showing at which landmarks the shape difference is concentrated is shown in Figure 3. Accordingly, LM1, 3, 5, 6, 7, and 9 in females and LM1, 3, 4, 5, 6, and 7 in males were the LMs where variation was concentrated.

DFA plots are shown in Figure 4 and 5. According to DFA, female Honamlı skulls showed a shape difference compared to Hair skulls in a rostro-dorsal direction in LM1, 5, 7, and 10, caudo-ventral in LM3, 6, and 9, and rostro-ventral in LM4. Female Kilis skulls showed a difference in shape compared to Hair skulls in a caudo-dorsal direction at LM2, caudal at LM4, rostral at LM5, and rostro-dorsal at LM9. Female Saanen skulls showed a shape difference compared to Hair skulls in a rostro-ventral direction in LM1, rostro-dorsal in LM5 and 9, caudo-ventral in LM3 and 6, and caudo-dorsal in LM10. Female Kilis skulls showed a difference in shape compared to Honamlı skulls in a caudo-ventral direction in LM1, 7, and 10, rostro-dorsal in LM3, 6 and 9, caudo-dorsal in LM2 and 4, ventral in LM5 and rostro-ventral in LM8. Female Saanen skulls showed a difference in shape compared to Honamlı skulls in a caudo-ventral direction in LM1, 7, and 10, rostro-dorsal in LM3, 6, and 9, caudo-dorsal in LM4 and rostro-ventral in LM5. Female Saanen skulls showed a shape difference compared to Kilis skulls in rostro-ventral direction in LM1, 2, and 4, caudo-ventral in LM3 and 6, rostro-dorsal in LM7, caudal in LM9 and caudo-dorsal in LM10.

According to DFA, male Honamlı skulls showed a difference in shape compared to Hair skulls in a caudo-dorsal direction in LM2, rostral-ventral in LM4 and 6, caudal in LM5, rostral-dorsal in LM7, caudo-ventral in LM9 and rostral in LM10. Male Kilis skulls showed a shape difference compared to Hair skulls in a caudo-ventral direction at LM1 and 7, rostral-dorsal direction at LM3 and 9, caudo-dorsal direction at LM5, and rostral-ventral direction at LM8. Male Saanen skulls showed a rostral-ventral shape difference in LM1, caudo-dorsal in LM4 and 10, and rostral-dorsal in LM5 and 9 compared to Hair skulls. Male Kilis skulls showed a difference in shape

compared to Honamlı skulls in a caudo-ventral direction in LM1, 7, and 10; rostral-dorsal in LM2, 5, and 9; caudo-dorsal in LM3, 4, and 6; and rostral-ventral in LM8. Male Saanen skulls showed a shape difference compared to Honamlı skulls in a rostral-ventral direction in LM1 and 2, caudo-dorsal in LM3, 4, 6, and 10, rostral-dorsal in LM5 and 9, and caudo-ventral in LM7 and 8. Male Saanen skulls showed a shape difference compared to Kilis skulls in the rostral direction in LM1, rostral-ventral in LM2, caudo-ventral in LM3 and 6, caudo-dorsal in LM4, 9, and 10, and rostral-dorsal in LM5 and 7.

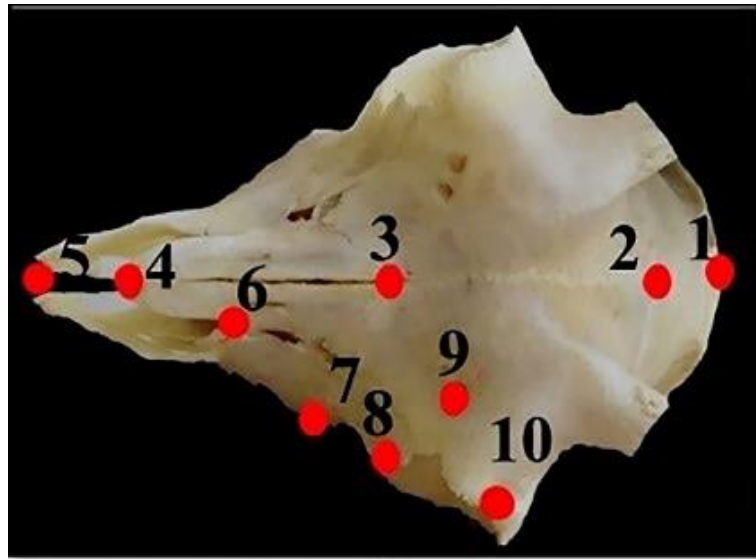


Figure 1: Landmarks marked from dorsal on the skulls of female Hair (1: Protuberantia occipitalis externa, 2: The junction of sutura coronalis and sutura interfrontalis, 3: Median point of the Sutura frontonasalis, 4: Rostral end of sutura internasalis, 5: The rostral end of the fissura interincisiva, 6: Incisura nasoincisiva, 7: Tuber faciale, 8: Medial angle of the orbit, 9: Foramen supraorbitale, 10: Caudo-ventral corner of the margo supraorbitalis).

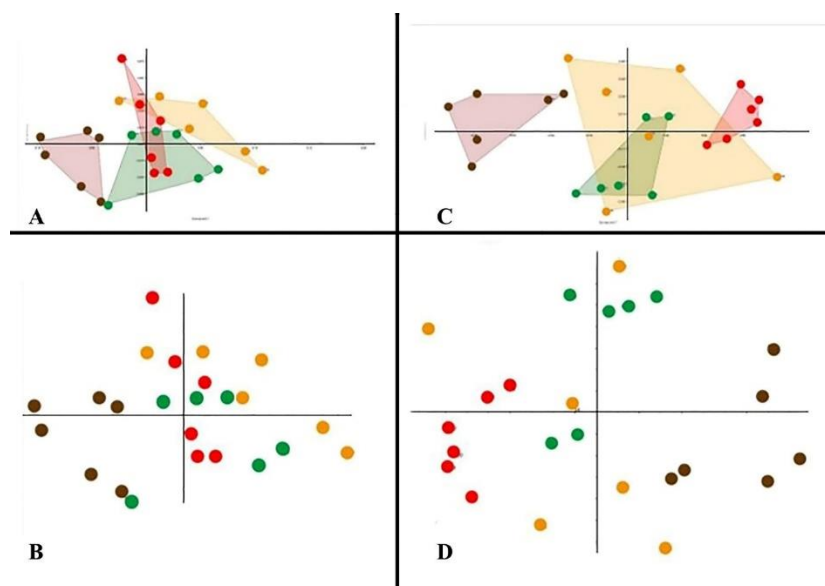


Figure 2: A. PCA plot for female, B. RWA plot for female, C. PCA plot for male, D. RWA plot for male. brown: Honamlı, green: Hair, orange: Kilis, red: Saanen

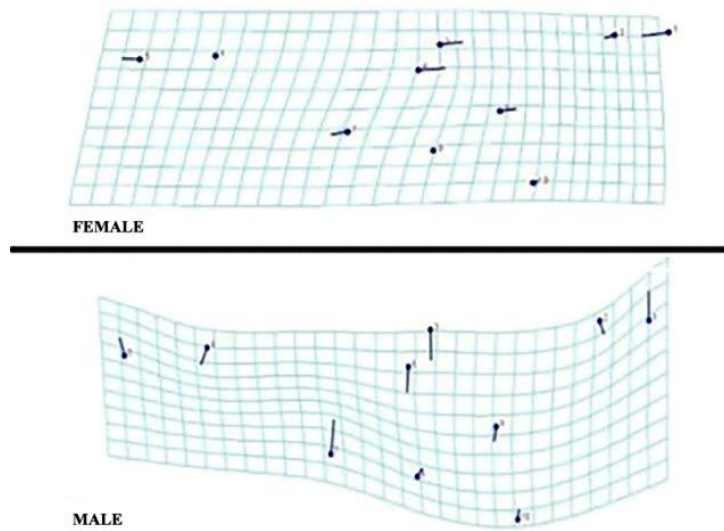


Figure 3: Transformation grid model of Honamlı, Hair, Kilis, and Saanen goat skulls according to the PC1.

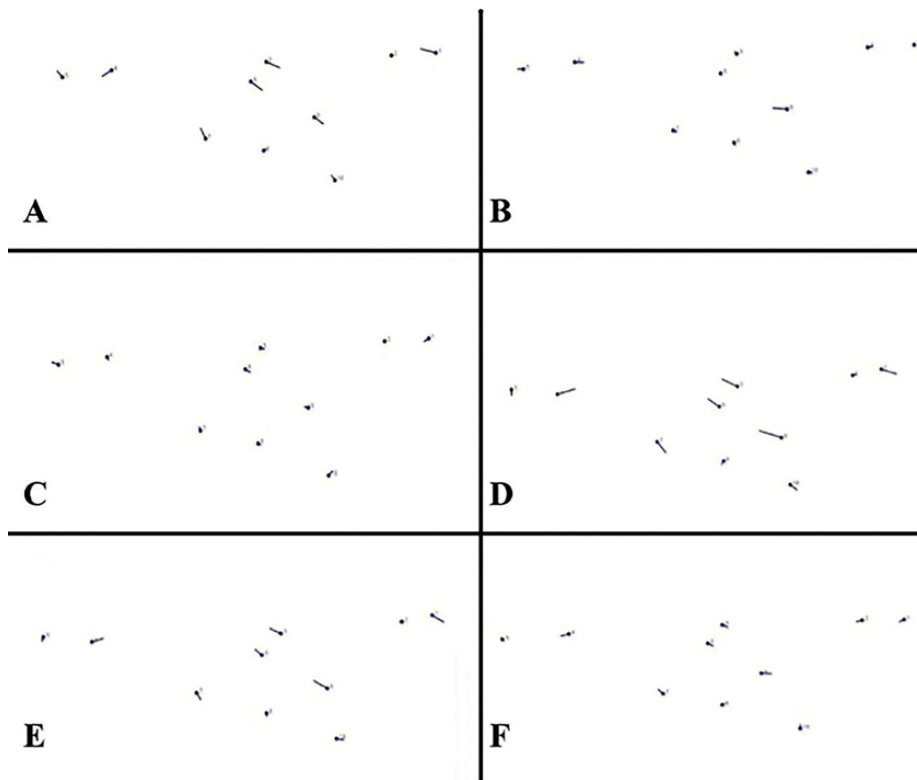


Figure 4: Graphs of discriminant function analysis of shape variation according to breed for female goats A. Hair-Honamlı, B. Hair-Kilis, C. Hair-Saanen, D. Honamlı-Kilis, E. Honamlı-Saanen, F. Kilis-Saanen.

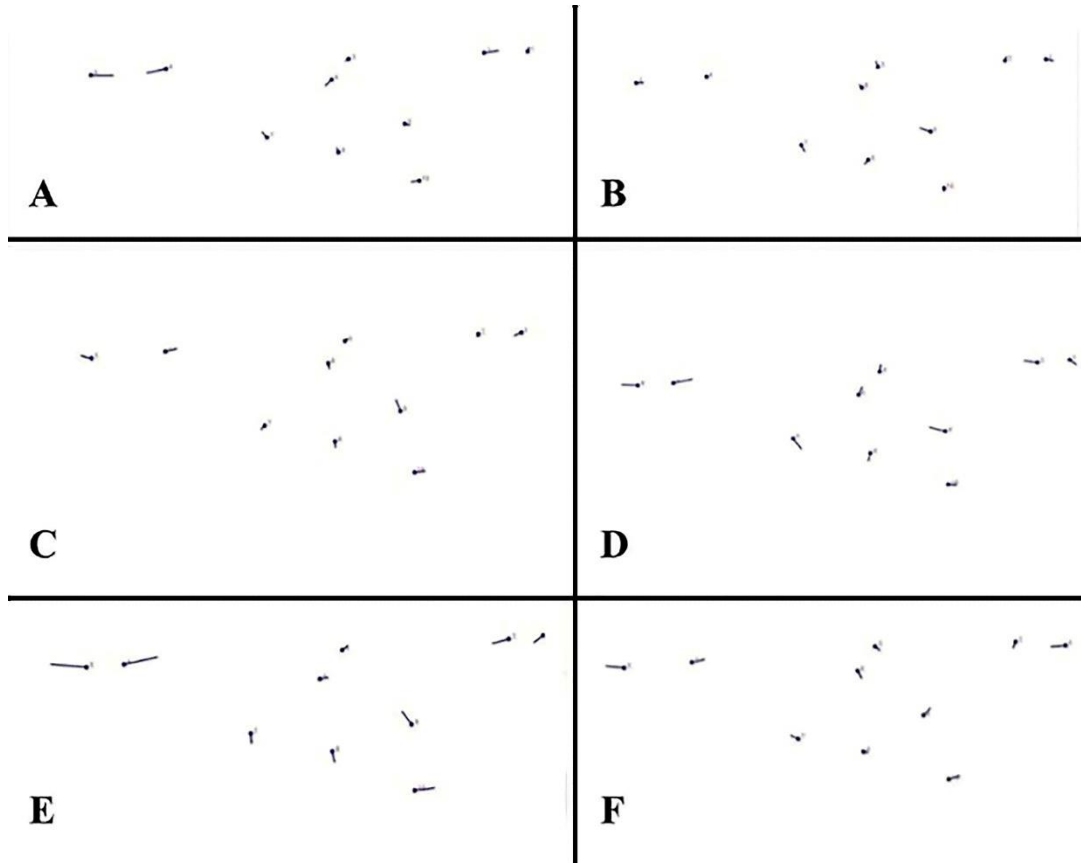


Figure 5: Graphs of discriminant function analysis of shape variation according to breed for male goats A. Hair-Honamlı, B. Hair-Kilis, C. Hair-Saanen, D. Honamlı-Kilis, E. Honamlı-Saanen, F. Kilis-Saanen.

DISCUSSION

In this study, we analyzed the skulls of breed-registered goats living in different geographical regions by geometric morphometric methods from the dorsal aspect. The overarching goal of the study was to determine whether racial dimorphism is also shaped in the dorsal skull. Preliminary findings from this study with a limited number of skulls showed that there is limited variation between breeds in the dorsal part of the goat skull.

Casanova and Miquel (2015), carried out a geometric morphometric study on the dorsal dorsum of the skulls of White Rasquera goats for sex discrimination. In their study, they reported that PCA-1 explained 41.7% of the shape variation. In our study, PCA-1 explained 50.628% of the total shape variation in females and 42.268% in males in the analysis performed to differentiate skulls of different races within the same sex. Casanova and Miquel (2015), reported that White Rasquera breed goats showed sexual dimorphism in a dorsal directional geometric morphometry study of the skull. In our study, the degree of dorsal separation of the skulls by race was limited.

Demiraslan et al. (2021), in their geometric morphometric study on the mandible of Honamlı and Hair goats, reported that Hair goats showed a very distinct gender difference compared to Honamlı goats, and that male goats were clearly clustered compared to female goats in terms of race factor. In our study, the degree of dorsal separation of skulls by breed was limited and the most prominent clustering was seen in Honamlı skulls in females and Honamlı and Saanen skulls in males.

Demircioğlu et al. (2021), conducted a geometric morphometric study on the skull and mandible of Awassi sheep. For this purpose, they analyzed the skull from 17 dorsal, 16 left lateral and 20 mandible s from 20 left lateral photographs. They reported that the first principal component explained 37.719% and 44.238% of the total shape variation in the dorsal and left lateral directions of the skull of Awassi sheep, respectively. In the mandible, they stated that the first principal component explained 24.92% of the total shape difference. In the analysis of the skulls from the dorsal and left lateral direction, they reported that there was a significant variation between the sexes, but no such variation in the mandibles. In our study, the skulls of Honamlı, Hair, Kilis, and Saanen goats were examined dorsally between the breeds of the

same sex. PCA-1 explained 50.628% of the total shape variation in females and 42.268% in males. Dorsally, the degree of separation of skulls by race was limited. Demircioğlu et al. (2022), compared the skulls of Hamdani and Awassi sheep using dorsal and lateral LMs. In the dorsal and lateral comparison of the breeds, they reported that the first principal components explained 41.905%, and 39.078% of the total shape variations, respectively. In our study, Honamlı, Hair, Kilis, and Saanen skulls were evaluated dorsally at the same time, considering gender differences. PCA-1 value was 50.628% in females and 42.268% in males. Demircioğlu et al. (2022), reported that Hamdani skulls were clustered to the right of the y coordinate and Awassi skulls to the left of the y coordinate according to PCA graph data from dorsal and lateral. In our study, in the dorsal evaluations of female Honamlı, Hair, Kilis, and Saanen skulls, it was observed that all female Honamlı skulls were clustered to the left of the y coordinate, while female Hair, Kilis and Saanen skulls were mostly clustered to the left of the y coordinate. In the dorsal view of male Honamlı, Hair, Kilis, and Saanen skulls, it was observed that all male Honamlı skulls were clustered to the left of the y coordinate, all male Saanen skulls were clustered to the right of the y coordinate, and male Hair skulls were clustered mostly above the x coordinate. Male Kilis skulls showed a scattered distribution. Demircioğlu et al. (2022), according to the consensus graphic data they obtained, reported that vector variation was concentrated in LM3, 8, 9, and 10 from the dorsal and LM1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, and 12 from the lateral. In our study, in female Honamlı, Hair, Kilis, and Saanen skulls, vectorial variation was concentrated in LM1, 3, 5, 6, 7, and 9 dorsally. In male Honamlı, Hair, Kilis and Saanen skulls, vectorial variation was concentrated in LM1, 3, 4, 5, 6 and 7 from the dorsal side.

Yalçın and Kaya (2009), used the skull bones of adult and female Anatolian wild sheep and adult and female Akkaraman sheep and examined them basally and dorsally. The PCA-1 values of the dorsal and basal skull bones of both species were 58.55% and 65.93%, respectively. In the PCA graphs made from the dorsal and basal sides, it was reported that Akkaraman sheep skull bones were clustered to the left of the y coordinate, while Anatolian wild sheep skull bones were clustered to the right. As a result of the analysis they reported that a significant variation occurred between the skull bones of both species. In our study, PCA-1 values of male and female Honamlı, Hair, Kilis, and Saanen goats were found to be 50.628, and 42.268%, respectively. According to the PCA plot from the dorsal side, all female Honamlı goat skulls were clustered to the left of the y coordinate, while female Hair, Kilis, and Saanen skulls were clustered to the right of the y coordinate. In the dorsal view of male Honamlı, Hair, Kilis, and Saanen skulls, it was observed that all male Honamlı skulls were clustered

to the left of the y coordinate, all male Saanen skulls were clustered to the right of the y coordinate, and male Hair skulls were clustered mostly above the x coordinate. Male Kilis skulls showed a scattered distribution. In our study, the degree of dorsal separation of Honamlı, Hair, Kilis, and Saanen goat skulls was limited and the most prominent clustering was seen in Honamlı skulls in females and Honamlı and Saanen skulls in males.

Yaprak et al. (2022), examined male and female Honamlı, Hair, Kilis, and Saanen skulls from basal. They found PCA-1 values of 30.319 % for females and 28.164 % for males. They reported that there was a limited separation between breeds and the most prominent clusters were between Kilis and Saanen skulls in females and between Honamlı and Kilis skulls in males. In our study, male and female Honamlı, Hair, Kilis, and Saanen skulls were examined dorsally. PCA-1 explained 50.628% of the total shape variation in females and 42.268% in males. There was a limited separation between breeds and the most significant clustering was observed in Honamlı skulls in females and Honamlı and Saanen skulls in males. Yaprak et al. (2022), reported that vectorial variation was concentrated in LM1, LM9, and LM10 in females and LM5, LM6, LM7, and LM8 in males. In our study, LM1, 3, 5, 6, 7, and 9 in females and LM1, 3, 4, 5, 6, and 7 in males were the LMs where variation was concentrated.

CONCLUSION

In this study, for the first time, the skulls of Honamlı, Hair, Kilis, and Saanen goats were analyzed for the presence of dorsal breed dimorphism by geometric morphometric methods. In this study, the first inferences were obtained that racial discrimination among goats from the dorsal aspect of the skull may be possible. It may be suggested that the findings of the study should be further elaborated by including more skulls and different breeds of goats. Despite all these, it is thought that the data presented in this study will contribute to the morphometric studies to be carried out in ruminantia skulls

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

Authors Contribution Rate: The authors declared that they contributed equally to the article.

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".

Financial Support: No support received

Explanation: It is summarized from the author's doctoral thesis titled "Analysis of Cranium in Kil, Kilis, Honamlı and Saanen Goats by Geometric Morphometric Methods".

REFERENCES

- Casanova P, Miquel P.** Geometric Morphometrics to the Study of Skull Sexual Dimorphism in a Local Domestic Goat Breed. *J Fisheries Livest Prod.*2015; 3(3):1-4.
- Ceyhan A, Karadağ O.** Marmara Hayvancılık Araştırma Enstitüsünde yetiştirilen Saanen keçilerin bazı tanımlayıcı özellikleri. *J. of Agricultural Sci.*2009;15(2):196-203.
- Demiraslan Y, Özgel Ö, Gürbüz I, Zümre Ö.** The mandibles of the Honamlı and Hair goat (*Capra hircus*); a geometric morphometric study. *Ankara Univ Vet Fak Derg.*2021;68: 321-328.
- Demircioğlu I, Demiraslan Y, Gürbüz I, Dayan MO.** Geometric morphometric analysis of skull and mandible in Awassi ewe and ram. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2021; 27(1):43-49.
- Demircioğlu I, Demiraslan Y, Güzel BC, Koçyigit A, Demircioğlu A.** Comparison of Cranium Shape in Hamdani and Awassi Sheep using Dorsal and Lateral Landmarks. *Pakistan J. Zool.*2022;1-6.
- Günlü A, Alaşahan S.** Türkiye’de keçi yetiştiriciliği ve geleceği üzerine bazı değerlendirmeler. *Vet Hekim Der Derg.* 2010; 81(2):15-20.
- Hammer Q, Harper DAT, Ryan PD.** PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.*2001; 4(1):9.
- Haruda AF.** Separating sheep (*Ovis aries* L.) and goats (*Capra hircus* L.) using geometric morphometric methods: an investigation of Astragalus morphology from late and final Bronze age central asian contexts. *Int. J. Osteoarchaeo.* 2017; 27(4):551-562.
- Karadağ O, Soysal MI.** Honamlı keçilerinin bazı döl verimi, büyüme ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi. *Jotaf.*2018; 15(1):135-142.
- Kaymakçı M, Aşkın Y.** Keçi Yetiştiriciliği. Baran Ofset, Ankara.1997.
- Kaymakçı M.** Keçi Yetiştiriciliği. Meta Basım Matbaacılık, Bornova, İzmir.2006.
- Kimmerle EH, Ross A, Slice D.** Sexual dimorphism in America: geometric morphometric analysis of the craniofacial region. *J Forensic Sci.*2008; 53(1):54-57.
- Klingenberg CP.** MorphoJ: an integrated software package for geometric Morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* 2011; 11:353–357.
- Pares Casanova PM, Domenech Domenech X.** A comparative analysis of sphenoid bone between domestic sheep (*ovis aries*) and goat (*capra hircus*) using geometric morphometrics. *Anat. Histol. Embryol.*2021; 50(3):556-561.
- Rohlf FJ, Marcus LF.** A revolution morphometrics. *Tree.*1993; 8(4):129-132.
- Rohlf FJ.** TpsSmall Version 1.34. Ecology & Evolution. SUNY at Stone Brook, USA.2017.
- Slice DE.** Modern morphometrics in physical anthropology. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, USA.2005.
- Şengonca M, Koşum N.** Koyun ve Keçi Yetiştirme. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.2005.
- Viscosi V, Cardini A.** Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. *PloS one.* 2011; 6(10):1-20.
- Yalçın BC.** Sheep and goats in Turkey. *FAO Animal Production and Protection Paper 60, Rome.*1986; pp. 82-84.
- Yalçın H, Kaya MA.** Anadolu Yaban Koyunu ve Akkaraman Koyununun kafa kemikleri üzerinde karşılaştırmalı geometrik morfometri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 2009; 4(2):105-116.
- Yaprak A, Demiraslan Y, Özgel Ö.** Investigation of the Skull Basally in Honamlı, Hair, Kilis and Saanen Goats Using Geometric Morphometric Methods. *Harran Üniv Vet Fak Derg.* 2022; 11(2):179-184.
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheet HD.** Geometric Morphometrics For Biologists; A Primer. 2thEd., Academic Press Elsevier Inc, USA.2012.
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheet HD, Fink WL.** Geometric Morphometrics For Biologists; A Primer. 1thEd., Academic Press Elsevier Inc, USA.2004.

A Study on Evaluation of the Offprint Titled “Is glanders disease treatable? Is it possible to supply and apply vaccines and serum for glanders?”

Abdullah KARA¹, Erhan YÜKSEL^{2*}, Özlem YÜKSEL², Mustafa ÇAVDAROĞLU³

¹Gaziantep University, Faculty of Arts and Science, Department of History, 27470, Gaziantep, Türkiye

²Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Medicine History and Deontology, 58140, Sivas, Türkiye

³Istanbul University, Faculty of Letters, Department of History, 34134, İstanbul, Türkiye

ABSTRACT

Early information about glanders in Turkey (in Ottoman Period) can be found in the letters of the veterinarian physician Godlewsky, the founder of the Military Veterinary School, and the disease was reported to be first diagnosed in 1912 in İstanbul. Military veterinary physician and bacteriologist Osman Nuri Eralp (1877-1940), veterinary physicians Ahmet Bey (1890-1928), and veterinarian physician Hüdâi Bey (1898-1928) pioneered scientific research on glanders. This study aims to transliterate and evaluate the offprint titled “Ruam kâbil-i tedavi midir? Ruama karşı aşı ve serum istihzar ve tatbiki mümkün müdür?” (Is glanders disease treatable? Is it possible to supply and apply vaccines and serum for glanders?) which was printed in Arabic letters and compiled the studies and findings of the studies Osman Nuri Eralp, Ahmet Bey and Hüdâi Bey. It is believed that this study, based on the transliteration and content evaluation, is important for studies on research history in general, and for veterinary medicine in specific, as this offprint establishes a starting point for studies on glanders in Turkey and reflects scientific research principles in the given period.

Keywords: Ahmet Bey, glanders, history of veterinary medicine, Hüdâi Bey, Osman Nuri Eralp

“Ruam Kâbil-i Tedavi midir? Ruama Karşı Aşı ve Serum İstihzar ve Tatbiki Mümkün müdür?” Başlıklı Ayrı Basımın Değerlendirilmesi Üzerine Bir Araştırma

ÖZ

Ruama dair Türkiye’de (Osmanlı Dönemi) ilk bilgilere Askerî Baytar Mektebinin kurucusu Veteriner Hekim Godlewsky’nin mektuplarında rastlanmakta olup, hastalığın ilk olarak 1912 yılında İstanbul’da teşhis edildiği bildirilmiştir. Ruam ile ilgili bilimsel araştırmalara Askerî Veteriner Hekim ve Bakteriyolog Osman Nuri Eralp (1877-1940), Veteriner Hekim Ahmet Bey (1890-1928) ve Veteriner Hekim Hüdâi Bey’in (1898-1928) öncülük ettiği görülmektedir. Bu çalışmada Askerî Veteriner Hekim ve Bakteriyolog Osman Nuri Eralp, Veteriner Hekim Ahmet Bey ve Veteriner Hekim Hüdâi Bey tarafından yürütülen çalışmalar ve sonuçlarının derlendiği, Arap harfleriyle yayımlanmış “Ruam kâbil-i tedavi midir? Ruama karşı aşı ve serum istihzar ve tatbiki mümkün müdür?” başlıklı ayrı basımın transliterasyonu ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Yapılan transliterasyon ve içerik değerlendirmesine dayanarak; ayrı basımın içeriğinin, Türkiye’de ruam hastalığı ile ilgili çalışmalar açısından orjin teşkil etmesi ve dönemin bilimsel çalışma prensiplerini yansıtması açısından genel de bilim tarihi araştırmaları özel de ise veteriner hekimliği tarihi açısından önemli olduğu ileri sürülebilir.

Anahtar kelimeler: Ahmet Bey, Hüdâi Bey, Osman Nuri Eralp, ruam, veteriner hekimliği tarihi.

To cite this article: Kara A. Yüksel E. Yüksel Ö. Çavdaroğlu M. A Study on Evaluation of the Offprint Titled “Is glanders disease treatable? Is it possible to supply and apply vaccines and serum for glanders?”. Kocatepe Vet J. (2023) 16(1):93-108

Submission: 23.11.2022 Accepted: 08.03.2023 Published Online: 13.03.2023

ORCID ID; AK: 0000-0002-9771-7950, EY: 0000-0002-0735-0375, ÖY: 0000-0003-0635-3256, MÇ: 0000-0003-2031-0535

*Corresponding author e-mail: erhanyukcell@hotmail.com

GİRİŞ

Ruam hastalığının etkeni olan *Pseudomonas mallei*, Almanya'da Loeffler ve Schutz tarafından 1882 yılında teşhis edilmiştir. Devamında 19. yüzyıl sonlarında hasta hayvanlara enjekte edildiğinde deride reaksiyon göstererek ruam tanısını sağlayan *mallein*'in keşfi, ruam hastalığı ile mücadelede yeni bir dönem başlatmıştır. Mallein ile birlikte tüm Dünya'da hastalığın kontrolü ve eradikasyonuna yönelik çalışmalar 20. yüzyıl boyunca devam etmiş ve 1993 yılında gerçekleştirilen araştırmalar neticesinde etkenin ismi *Burkholderia mallei* olarak değiştirilmiştir (Yabuuchi et al. 1992, Derbyshire 2002).

Türkiye'de ruam ile ilgili ilk bilgilere Askeri Baytar Mektebi kurucusu Prusyalı Veteriner Hekim Godlewsky tarafından yazılan mektuplarda rastlanmaktadır (Erk 1972). Ruam, Türkiye'de ilk olarak 1912 yılında nalbantlık yapan bir askerde, Küçükçekmece hastanesi tabibi Yüzbaşı Abdülkadir Bey (Ord. Prof. General Abdülkadir Noyan) ve Halkalı Hayvan Hastanesi veteriner hekimlerinden Teğmen Şefik Bey tarafından tespit edilmiştir (Uçar 1960). Türkiye'de ruam ile ilgili bilimsel araştırmalar Askerî Veteriner Hekim ve Bakteriolog Osman Nuri Eralp (1877-1940), Veteriner Hekim Ahmet Bey (1890-1928) ve Veteriner Hekim Hüdâi Bey (1898-1928) öncülüğünde devam etmiştir. Binbaşı Ahmet Bey ve Yüzbaşı Hüdâi Bey'in, ruam hastalığına yakalanarak vefat etmelerinin ardından Osman Nuri Bey ile yaptıkları ortak çalışmalar derlenmiş ve ayrı bir broşür halinde yayımlanmıştır (Türkay 1948, Uçar 1969, Unat 1970, Başağaç 2001, Melikoğlu 2007). Ruamla ilgili yapılan çalışmaların devamında bayrağı Kemal Cemil Bey (1902-1934) devralmış, *anamorve* ismini verdiği aşığı geliştirmiş ancak kendisi de bu hastalığa yakalanarak 1934 yılında vefat etmiştir (Yalçın 1954, Başağaç 2001, Öztürk ve Başağaç 2002). Neredeyse yüz yıla yakın bir sürede gerçekleştirilen tüm bu çalışmaların Türkiye'de ruam hastalığının söndürülmesi ve eradikasyon sürecine önemli katkılar sunduğu ifade edilmektedir (Osmanoğlu ve Melikoğlu 2009). Bununla birlikte ruam hastalığının 2001 yılında eradike edilmesine rağmen, 2017 ve 2019 yıllarında İstanbul Adalar İlçesinde tekrar ortaya çıktığı ancak ilgili kurumlarca yapılan çalışmalar neticesinde salgının sona erdirildiği bilgisine ulaşılmaktadır (Doğanay et al. 2020).

Bu çalışmada, daha önce tıpkıbasımını içeren herhangi bir çalışmaya ulaşamayan Baytar Tatbikat Mektebi öğretmenlerinden Osman Nuri Eralp ile ruam hastalığına yakalanarak vefat eden meslek şehitleri Veteriner Hekim Ahmet Bey ve Veteriner Hekim Hüdâi Bey tarafından ruam hastalığıyla mücadele amacıyla yürütülen çalışmaların derlendiği *Ruam kâbil-i tedavi midir? Ruama karşı aşı ve serum istihzar ve tatbiki mümkün müdür?* başlıklı Arap harfleriyle yazılı metnin transliterasyonunun yapılması, genelde veteriner hekimliği tarihi özelde ise Türkiye'de ruam hastalığı ile

mücadeleye katkıları yönüyle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmanın ana materyalini İstanbul Büyükşehir Belediyesi Atatürk Kitaplığında "Bel_Osm_O.02095" demirbaş numarası ve "Ruam kâbil-i tedavi midir? Ruama karşı aşı ve serum istihzar ve tatbiki mümkün müdür?" başlığıyla yer alan ayrı basım oluşturmuştur. Arap harfleri ile basılı olan ayrı basım metninin içeriği yazarlar tarafından çevrilerek transliterasyona aktarılmıştır. Metin içeriğinin transliterasyonu, bulgular bölümünde ayrı basımın kapak bilgilerinin ardından sunulmuş ve veteriner hekimliği tarihi açısından değerlendirilmeye çalışılmıştır.

BULGULAR

Ayrı basım metninin transliterasyonu ve incelenmesi esnasında, metnin 1926-1927 yıllarında "Askerî Tıbb-i Baytarî Mecmûa"da yayımlanan üç çalışmanın ayrı basım haline getirilmesi ile oluşturulduğu bilgisine ulaşılmıştır. Ayrı basımı oluşturan üç çalışmaya ait bilgiler şöyledir:

1. Muavin Ahmed, Muallim Osman Nuri (Bakteriyoloji laboratuvarı mesaisinden); Ruam kâbil-i tedavi midir-Ruama karşı aşı ve serum istihzar ve tatbikatı mümkün müdür? Kobay ve tavşanlarda muafiyet meselesi, Askerî Tıbb-i Baytarî Mecmûa, 1926, cilt 4, sayı 1, s. 4-10.
2. Ahmed, Muallim Osman Nuri (İkinci muhtıra/Mabad); Ruam kâbil-i tedavi midir-Ruama karşı aşı ve serum istihzar ve tatbikatı mümkün müdür? Kobay ve tavşanlarda muafiyet meselesi, Askerî Tıbb-i Baytarî Mecmûa, 1926, cilt 4, sayı 5, s. 133-183.
3. Ahmed, Muallim Osman Nuri (Üçüncü muhtıra sene 4 cilt 4 sayı 5 den mabad); Ruam kâbil-i tedavi midir-Ruama karşı aşı ve serum istihzar ve tatbikatı mümkün müdür-Danaya ölmüş ve diri ruam basili telkihât-ı tecâribi, Askerî Tıbb-i Baytarî Mecmûa, 1927, beşinci sene, sayı 3, s. 83-87.

Bu doğrultuda bahsi geçen süreli yayında yer alan üç yayın da yazarlar tarafından incelenmiş olup metin içeriklerinin ayrı basım metniyle karşılaştırması yapılmıştır. Ayrı basımın 8. sayfasında sıralanan çalışmanın amaçları bölümünde 1. ve 2. maddenin devamında 3. maddeden önce verilen açıklamalar, tıpkı *Askerî Tıbb-i Baytarî Mecmûa*'da da olduğu gibi anlam bütünlüğünü sağlamak adına sayfa numarası kaydırılmadan 3. maddenin sonrasında verilmiştir. İnceleme esnasında 30 sayfadan oluşan ayrı basımın 17. sayfasından itibaren sunulan patoloji sonuçlarına

ait bölüm ilk üç yayında bulunmayıp düzenleme heyeti tarafından bahsi geçen süreli yayında yer alan çalışmalarından derlenerek ayrı basıma eklendiği tespit edilmiştir.

Patoloji sonuçlarına dair bilgileri içeren bu bölüm dışında ilk üç yayından farklı olarak ayrı basıma ekleme ya da çıkarma yapılmadığı tespit edilmiştir.

Metnin ön kapağında; ayrı basımın “Askerî Tıbb-i Baytarî Mecmûası”nın 7 numaralı külliyatından (Dinçer 1971) olduğu, 1928 yılında Hüsn-i Tabiat Matbaası’nda basıldığı, “Askerî Baytar Tatbikat Mektebi ve Serîriyyâtı Bakterioloji ve Teşrih-i Marazî Laboratuvarı”nın¹ ortak çalışmasından olduğu, Bakterioloji Laboratuvarı Şefinin “Sıhhiye ve Muâvenet-i İctimâiyye Vekâleti İstanbul Bakterioloji Müessesesi Müdürü Muallim Bakteriolog² Osman Nuri”, Teşrih-i Marazî Laboratuvarı Şefinin ise Muallim Mehmed Azmi olduğu bilgileri yer almaktadır. Yine metnin ön kapağında ilim şehidi Askeri Baytar Tatbikat Mektebi ve Serîriyyâtı Bakterioloji Muallim Vekili Binbaşı Ahmed Bey’in ismi ile “Ruam kâbil-i tedavi midir? Ruama karşı aşı ve serum istihzar ve tatbiki mümkün müdür?” başlığı yer almaktadır (Resim 1a, 1b). Ayrı basımın arka kapağında ön kapakta yer verilen bilgilerin Fransızca halî mevcuttur.

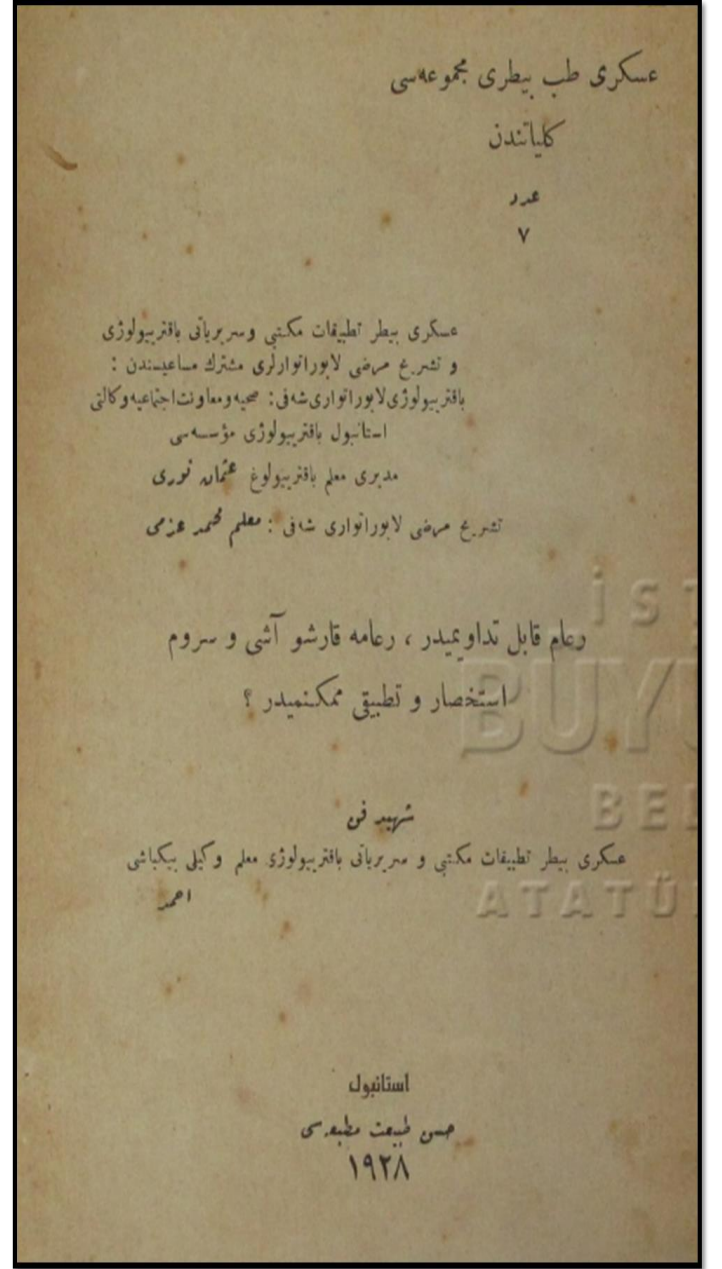
Ayrı basımın, ön iç kapağında 10 maddeden oluşan içindeler bölümü yer almakta olup devamında ise düzenleme heyetine ait iki sayfadan oluşan “Birkaç Söz” başlıklı yazı bulunmaktadır. Bu yazıda; *İlim kurbanımız Muallim Bakteriolog Baytar Ahmed Bey’in (1923) senesinden beri memleketimizin ekonomisine giren, ordunun savaş gücü olan beygîrler ve emsali hayvanlar zümresi arasında pek büyük ziyata sebebiyet veren amansız ruam hastalığına karşı aşı ve serum yapmak ümidiyle diri ve ölü kültürlerle adeta hayatını hiçe sayıncasına bir sürü küçük ve büyük hayvanlar üzerinde Hıfzussıhha ve Muâvenet-i İctimâiyye Vekâleti Bakterioloji Müessesesi Müdürü (Sağlık Koruma ve Toplumsal Yardımlar Bakanlığı Bakterioloji Kurumu Müdürü) ve merhumun ve birçok baytarların hocası olan Muallim Osman Nuri Bey’in nezareti altında araştırma ve tecrübeye Başmuavin Yüzbaşı Akif ve Muavini Yüzbaşı Sadık Beylerle beraber ülkemizde ilk defa olarak teşebbüs etmiş.... ve Avrupa Fen âleminde alaka uyandırdığından dolayı (Schütz Ellenberger Vohresbericht) namındaki Almanca kitabesinde 1927’de bir kısmı intişar etmiş idi* ifadesi yer almaktadır. Devamında; tedavi anlamında verimli sonuçlar alınamamasına karşın yapılan çalışmaların fedakârca yürütüldüğü ve bilim dünyası açısından çok kıymetli olduğu, Ahmet Bey ve Hüdâi Bey’in bu yolda hayatlarını feda ettiğine vurgu yapılmakta olup, ‘Birkaç Söz’ başlıklı yazı *Heyet-i Tertibiyye* imzasıyla *Ey Yeni Nesil, Ey Kutsal Gençlik ceht ve gayret hususunda bu düstur-ı mesai size de rehber hedef olsun,*

1 Askeri Veteriner Uygulama Okulu ve Kliniği Bakterioloji ve Patoloji Laboratuvarı

2 Bakterioloji Laboratuvarı Şefi: Sağlık ve Toplumsal Yardımlar Bakanlığı İstanbul Bakterioloji Kurumu Müdürü Öğretmen Bakteriolog

Bu satırlar okununca merhumların ruhları ebediyen şad olsun cümlesi ile sonlanmaktadır.

Beşinci sayfada Şehit Merhum Bakteriolog Baytar Binbaşı Muallim Ahmet Bey’in resmi bulunmaktadır (Resim 2).



Resim 1a: Ayrı basımın orijinal kapak sayfası
Figure 1a: Offprint original cover page.

Askerî Tıbb-i Baytarî Mecnûası
Külliyatından
numro
7

Askerî Baytar Tatbikat Mektebi ve Serîriyyât-ı Bakteriyoloji ve Teşrîh-i Marazî Laboratuvarları Müşterek
Mesaisinden: Bakteriyoloji Laboratuvarı Şefi: Sıhhiye ve Muâvenet-i İctimâiyye Vekâleti İstanbul
Bakteriyoloji Müessesesi
Müdürü Muallim Bakteriyolog Osman Nuri
Teşrîh-i Marazî Laboratuvarı Şefi: Muallim Mehmed Azmi

Ruam Kâbil-i Tedavi midir? Ruama Karşı Aşı ve Serum İstihzar ve Tatbiki Mümkün müdür?

Şehîd-i Fen

Askerî Baytar Tatbikat Mektebi ve Serîriyyât-ı Bakteriyoloji Muallim Vekili Binbaşı Ahmed

İstanbul

Hüsn-i Tabîat Matbaası

1928

Resim 1b: Ayrı basımın transliterasyona aktarılmış kapak sayfası.

Figure 1b: Offprint transliterated cover page.



Resim 2: Bakteriyolog Veteriner Binbaşı Ahmet Bey

Figure 2: Bacteriologist veterinary major Ahmet Bey.

Altıncı sayfadan itibaren metnin transliterasyonu şöyledir (Sayfa 6);

Ruam hastalığı tedavi edilebilir mi? Ruama karşı aşı ve serum hazırlamak ve kullanmak mümkün müdür?

Ruam mikrobik hastalığına karşı aşı ve serum gibi iyileştiren ve özellikle hastalığı önleyici bir madde yapmanın yolları hakkında bazı deneyler yapılmıştır. Her gün yeni eserleriyle araştırma sahası ve uygulaması genişleyen tıp, insan ve hayvan kaynaklı birçok hastalığın bilinmeyen sebeplerini araştırması, insanlığı, ekonomileri tahrip eden çeşitli hastalıklardan uzak tutma ve korunma çarelerini ortaya koymasına rağmen halen ruama karşı bir adım atamamıştır. Kitap haline getirilmiş veteriner hekimliğe ait eserlerde ruamla ilgili denenmiş ve uygulanmış kimyasal, serumsu tedavi usulleri az-çok farklılık göstermekle birlikte, sonuç itibarıyla pratikte uygulanabilir değildir. Ruamın bulaştığı organları tahrip ettiği açıktır. Bu nedenle tüm devletlerin Zabıta-i Sıhhiye-i Nizamaları bu mikrobik hastalığa yakalanmış hayvanların tedavisini değil, öldürülmesini zorunlu tutar. Şu halde bulaşma derecesi ve hastalık oluşturma olasılığı yüksek, sonuçları itibarıyla korkunç olan ruam hastalığına yakalananları tedavi ile uğraşmaktan vazgeçerek, sağlam olanları hastalığın etkilerinden koruma yollarının yazılması bu iş ile uğraşan ilim insanlarının aklına gelebilir. Konumuz dışında olan Zabıta-i Sıhhiye kanunları haricinde, bu hususta fenni bir usulün uygulama sahası olmadığı telif edilen eserlerde görülmektedir. Fakat fende mantık ve tam hâkimiyet aranmaz. Uygulanan bir deney usulünün azıcık farklı bulunması ile meydana çıkan bir sonuç, hayati derecede önemli bir prosedürün aksini gösterebilir. İşte bu düşünceyi göz önüne alarak deneylerimize başladık.

Uygulamaya 1924 Eylül'ünde başlanmıştır. Bu hususta deney ve uygulamada kullanılan hayvanlar: beygir, merkep, dana, tavşan ve kobaydan oluşmaktadır. Usulüne uygun yapılan aşılama sonucunda organizmada ruam karşıtı maddenin yani antikorların oluşup oluşmadığını ve bundan dolayı alınacak serumun iyileştirici ve koruyucu özelliğe sahip olup olmadığını araştırmak için doğal olarak ruam mikrobik bulaşıcı hastalığına karşı aşılanmış dana da deneye dâhil edilmiştir. Hedeflenen amaç doğrultusunda bu hayvanlar üzerindeki uygulamalar üç aşamada özetlenebilir. (Sayfa 8)

1. Bunlardan bazılarını doğrudan doğruya bağışıklık vererek bizzat bu hayvanlar üzerinde bağışıklığın gerçekleşmesini görmek.
2. Bağışıklık verilmesinden sonra bunlardan elde edilecek serumlarda ruama hassas diğer hayvanlar üzerinde deney yapmak.
3. Bağışıklık verilen bu hayvanlara sonradan ruam basili verilerek meydana gelecek sonuçları görmek.

Üzerlerinde takip edilen art arda gelen uygulamaların gösterilmesi için deney hayvanlarının iki kısma ayrılması gerekmektedir.

Birinci kısım: Kobay ve tavşanlardan oluşmaktadır. Ki bunlar çeşitli zamanlarda çeşitli miktarlarda, ölmüş ruam kültürü verilen birçok deney grupları içerisinde yer aldı.

İkinci kısım: Beygir, merkep ve danadır. Bunlar ölmüş basil aşılamaları ile bağışıklığa tabi tutulmuşlardır.

Sonradan bu hayvanlardan zaman zaman hacamat ile alınan serumlar, kobay, tavşan ve merkep üzerinde canlı ruam basili ile birlikte veya birbiri ardına yapılan deneysel aşılamalarda kullanılmıştır. Bunlar sırasıyla arz edilecektir.

Birinci kısım: Kobay ve tavşanlarda bağışıklık meselesi

Yukarıda birinci kısmı oluşturan kobay ve tavşanların birçok grubu içerdiklerini arz etmiştik. Şimdi bunlardan A grubunu ele alalım;

I. Bu grup bir kobay ile bir tavşandan oluşur.

II. Bu iki hayvana aşağıda eklediğimiz tablo gereğince ölmüş ruam basili kültürü 1 cm³ miktarından başlayarak cilt altına verildi. 20 gün boyunca devam eden uygulama miktarı toplamı 15 cm³'e ulaşmıştır (Tablo 1).

Bağışıklık kazandırmak için kullanılan madde (antijen) öldürülmüş ruam basili kültürleridir. Şöyle ki:

- a. Ruam basili başlangıçta gliserinli et sularını içeren balonlara tohumlanarak 38 derecelik etüvde 20 gün boyunca gelişip büyütüldü. (Sayfa 9)
- b. Bu sürenin sonunda kültürler 60 derecelik kuvvetli ısıda dört saat ısıtılarak ruam basilleri öldürüldü.
- c. Sonra gliserinli et suyu yerine gliserinli jeloz ortama ruam kültürü eklenip 48 saat etüvde gelişip büyümeye bırakıldı.
- d. Müteakiben 60 derecelik kuvvetli ısıda ısıtılma ile basiller öldürüldü.
- e. Basillerin tamamının öldüğü muayene ve tetkik edildikten sonra kültürler serum fizyolojik ile karıştırılarak istenilen yoğunlukta homojen bir süt gibi beyaz bir emisyon elde edildi.
- f. Hayvanlara aşılanmaya hazır bir hale getirilen bu ölmüş mikrop emisyonu (antijen) bütün işlem süresince hep bu esas dâhilinde hazırlandı.

III. Bu aşılama ile kobay ve tavşanların organizmasında ruam basiline karşı oluşması muhtemel antikorun etkili hale gelebilmesi için hayvanlar son aşılamadan sonra bir hafta dinlenmeye bırakıldı.

Şimdi bu hayvanlar ruama karşı bağışıklık kazandı mı kazanmadı mı? Bunu anlamak için;

- a. Bu iki hayvanın karın zarı içine canlı ruam basilinin et suyu kültüründen ¼ cm³ verildi.
- b. Basil enjeksiyonundan sonra hayvanlar ya ölecek ya da hayatta kalacaktır. Eğer ölüm gerçekleşirse olay ruam basilinden mi meydana gelmiştir, hayatta kalırlarsa bağışıklık kazanmışlar mıdır?
- c. Bunu inceleme ve karşılaştırma için hiçbir şey uygulanmamış kontrol amaçlı diğer bir kobay ve tavşanın da karın zarı içerisine aynı zamanda ¼ cm³ miktarında ruam kültüründen enjekte edildi.
- d. Sonra bu dört hayvan ayrı ayrı kafeslerde gözlem altına alındı.

Tablo 1. Enjeksiyon miktarları (Sayfa 10)
Table 1. Injection quantities (Page 10)

Netice	Canlı ruam basili		Öldürülmüş ruam basilinden enjekte miktarı	Enjeksiyon yapılan hayvanlar
Telef	¼ cm ³	Son enjeksiyondan sonra bir hafta terk	Birinci enjeksiyon 1 cm ³ İkinci enjeksiyon 1,5 cm ³ Üçüncü enjeksiyon 2,5 cm ³ Dördüncü enjeksiyon 4 cm ³ Beşinci enjeksiyon 6 cm ³	Kobay Tavşan
Telef	¼ cm ³ ¼ cm ³	Kontrol hayvanlar Sağlam kobay Sağlam tavşan		

Sonrasında,

- Şimdi elimizde esas olarak antijen aşılmasına tabi tutulmuş kobay da dâhil karın zarından yapılan canlı kültür enjeksiyonundan 19 gün sonra öldü. Ölmeden önce genel durum bitkin, testisler tavuk yumurtası büyüklüğünde hacimliyd. Üzerinde fark edilir bir durumda birkaç ruam yarası görüldü. Ceset açığının sol tarafında cilt altında büyük bir ceviz boyutunda bir çıban oluşmuş, büyüklüğü ve fazlaca değişimde bulunması ile dikkati çeken testislerin kesitinde bol, katılaşmış irinin yer aldığı görüldü. Karın boşluğunda dalak sıkışık, görünüşü değişmiş, ufak bir dokunmada parçalanmakta ve yüzeyinde yaygın kanama odakları görülmekteydi. Karaciğer aynı şekilde bozulmuş, lenf bezeleri büyümüşü. Göğüs boşluğunda kalbin ön ve arka kısımlarında küçük bir ceviz kadar ve yanında ise fındık büyüklüğünde olmak üzere içleri irin dolu iki adet çıban bulunmaktaydı. Diğer bölgelere göre daha az tahribata uğradığı görülen akciğerlerde kan toplanmaları ve kanamalar gözlemlendi. Çıban ve tahrip olmuş dokulardan yapılan mikroskop ve kültür muayenelerinde ruam basili belirlendi.

Kontrol grubunda yalnızca canlı ruam basili alan kobaya gelince; aşılardan 12 gün sonra öldü. Ölmeden önce ruam belirtileri göstermeye başlamıştı. Haricen aşı noktasında bir elma büyüklüğüne ulaşmış fark edilebilen büyüklükte (Sayfa 11) yumrular görüldü. Karın boşluğundaki dalak, böbrekler ve karaciğerin yapısı bozulmuş ve kırılabilir özellikteydi. Karaciğer üzerinde ekimozlar mevcut, ciğerlerde yazılmaya değer bir şey yoktu. Kültür usulüyle testislerin irininden ruam basili teşhis edildi.

Şimdi biri deney diğeri kontrol olan bu iki kobay arasında canlı basil verilmesinden itibaren ölünceye kadar geçen sürede iç organlarında ruamın neden olduğu hasarlar açısından bir kıyaslama yapılacak

olunursa, evvelce antijen alan ve bundan dolayı organları ölmüş basillerle aksi tesir gösteren birinci kobay aynı canlı ruam basili kültüründen aynı saatte aşı yapılan kontrol olan kobaydan 7 gün sonra ölmüş ise de iç organlarındaki hastalığa bağlı harabiyet kontroldekine göre daha derin ve daha belirgindir. Kontrol kobay da ruam belirtisi göstermiştir; fakat diğeri kadar yaygın ve belirgin değildir. Demek oluyor ki önceden antijen alan birinci kobayın organizması, sonraki canlı basil aşılmasında kontrole nazaran daha hassas daha etkili olmuş bulunuyor.

- Aynı zamanda ve aynı yöntemle ölmüş basil zerk edilen tavşan ise karın zarı içerisine canlı kültür verilmesinden 32 gün sonra öldü. Otopsisinde karın boşluğunda karaciğer üzerinde küçük boyutta tam şekillenmemiş 15 kadar ruam yumrucukları ile diğeri organlarda az miktarda yaygın kanama ve kan toplanması görüldü. Ciltteki yara ve karaciğer üzerindeki yumrucuklardan yapılan kültürlerden ruam basili izole edildi.

Bunun kontrolü olan tavşan ise; canlı basil enjeksiyonundan 82 gün sonra öldü. Ölmeden 10 gün öncesine kadar iştahı yerindeydi. Bundan sonra genel durumu bozuldu. Sol gözünde iltihaplanma ile birlikte derin doku tahribatı görüldü. Otopsisinde karaciğer ve dalağın temasla doku bütünlüğünün bozulduğu, akciğerlerin kanlanmış ekseri kan noktaları ve yumrucuklar içerdiği görülmüştür. Bu iç organlar, saklamak ve aynı zamanda kesilerek hastalık dokuları incelenmek üzere patoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Biri deney diğeri kontrol olan iki tavşandan daha önce antijen almış olan canlı basil enjeksiyonu sonrasında kontrolden 50 gün önce ölmüştü. Kobayda olduğu gibi burada da aynı fikir akla gelebilir. Bu tavşan aşılardan ölmüş kültür mikrobu antijeni nedeniyle az çok dayanıklılık, bağışıklık kazanması gerekirken veya böyle olması beklenirken aksine hiçbir muameleye tabi olmayıp

defalarca canlı basil alan kontrole göre daha fazla etkilenmişti. Bütün deneyler esnasında ölen veya itlaf edilen hayvanlara ait doku bozulmalarının değerlendirilmesi dikkat edilmesi gereken esas noktadır.

Çünkü ruamda, akkan damarı yangısı ekseri kronik bir mikrobik hastalığa karşı tedavi, korunma usullerinde dokularda oluşan bozulmalar da dâhil hepsinin bulunduğu (*Sayfa 12*) aşıkârdır. Bundan dolayı patoloji laboratuvarının bu hususa ait değerlendirme ve incelemeleri sonradan yayınıma ek olarak koyulacaktır.

B Grubu

Birinci kısmı oluşturan kobay ve tavşanlardan (B) grubuna dâhil bulunan hayvanların tabi tutuldukları deneyleri izah edeceğiz. Bu grubun içerdiği hayvanlar bir kobay ile bir tavşandır.

1. Bu iki hayvana ölmüş ruam kültüründen 1 cm³ miktarından başlayarak 55 gün zarfında aşamalı olarak artırılmak üzere cilt altına toplam 110 cm³ aşılama yapıldı.
2. Son aşılama sonrası hayvanlar bir hafta dinlenmeye bırakıldı.

Daha önce (A) grubundaki tavşan ile kobayda olduğu gibi bunların da bağışıklık kazanıp kazanmadığını tetkik ve muayene etmek gerekiyordu. Bundan dolayı ruam basiline et suyu kültüründen canlı olarak ¼ cm³ miktarında bu iki hayvanın cilt altına enjekte edildi.

- a. Neticede bu iki hayvan eğer ölürse ölüm sebeplerinin gerçek nedenini belirlemek ve kontrol etmek amacıyla hiçbir muameleye tabi tutulmayan bir kobay ile bir tavşan da kontrol olarak bu gruba eklendi.
- b. Bunlara da aynı zamanda cilt altına ¼ cm³ kadar canlı basil verildi. Hepsi ayrı kafeslerde gözleme alındı.

Sonuç:

1. 110 cm³ (antijen) aşılama tabi olan esas kobay canlı basil verilmesinden 10 gün sonra öldü. Ölmeden önce hayvanın genel durumunun bitkin, testislerinin oldukça hacimli, otopsisinde ise iç organlarında ruam hasarının az çok bariz olduğu görüldü.
2. Kontrol olan kobay kültür aşılama sonrası 14 gün sonra öldü. Ölmeden önce hayvanın hastalık belirtileri göstermesinin yanı sıra otopsisinde de iç organlarında ruam hastalığına bağlı hasarlar tespit edildi.
3. Antijen enjekte edilen esas kobay 15 günde belirti göstermeye başladı. Vücudunun çeşitli kısımlarında cilt üstünde sulu ve sonradan iltihaplı sızmalar baş göstermeye başladı. Gözleri tamamen irinleşerek kapandı. Bu arazın oluşmasının ardından (*Sayfa 13*) aşılamanın 22. günü hayvan öldü. Otopsisinde canlı basil enjekte edilen bölgedeki yara dışında dikkate değer bir hastalık göstergesi belirlenmedi.
4. Bunun kontrolü olan erkek tavşan ise basil aşılama sonrası 91 gün sonra öldü.

C. Grubu

Bunlar da aynı şekilde bir kobay ile bir tavşandan ibarettir.

Bu iki hayvan uzun bir süre ölmüş ruam basili ile deri altından (140 cm³) aşılama yaptı. Sonra aşılama sonrası verilerek bir süre dinlenmeye bırakıldı. Yani bu iki hayvana da diğerleri gibi canlı ruam basili enjekte edildi. Bunun amacı, ölmüş basillerin mikrop lu vücutta acaba iç organlarda ne gibi vaziyetler alıyor, dokularda ne gibi bozulmalar oluşturduğunu görmektir. Bunu anlamak maksadıyla bir müddet sonra öldürülerek iç organların hastalık dokularının incelenmesi uygun görüldü.

a. Kobay son aşılama sonrası 26 gün sonra havanın etkisine dayanamayıp kendi kendine öldü. Otopsisinde iç organlarında ruamı işaret eden bazı hastalık semptomları görüldü.

b. Tavşan son aşılama sonrası 42 gün sonra öldürülerek otopsi yapıldı. Karın boşluğunda gözle görülen yıkımlar, karaciğer tahribatı, ciğerlerde kanama belirtileri ile bir iki yumrunun varlığı gözlemlendi.

Bu iki hayvanın iç organları, ölü ruam basiline doğan bozulma derecesinin ve netice olarak uygulanan bu usul ile ruam mikrobik hastalığına karşı bağışıklık sağlama imkânının mevcut olup olmadığının incelenmesi için patolojiye gönderildi.

İkinci kısım: Beygir, merkep ve dana da bağışıklık kazanma durumu-bunlardan elde edilen serumlarla küçük hayvanlar üzerinde deneyler, bu hayvanlara canlı basil enjeksiyonu

Yapılan sınıflama gereğince şimdi ikinci kısmı oluşturan büyük hayvanların üzerinde uygulanan deneylerin safhalarını inceleyelim.

Ruama karşı hassas ve hassas olmayan bu üç hayvana bir seneyi aşkın süre zarfında ölmüş (*Sayfa 14*) ruam basili sıvısı önce cilt altına, sonradan damar içine olmak üzere aşılama yapılarak bağışıklık oluşturma aşamasına başlandı. Aşılamanın seyri esnasında özellikle ilk devrelerde hayvanlarda bölgesel veya genel esaslı belirtilmesi gereken tahribat tespit edilememiş, enjeksiyon sonrası bazen ortaya çıkan anormal olaylar kısa sürede bir hasar bırakmaksızın geçmiştir. Fakat aşılama sonrası çeşitli devrelerinde bu hayvanlardan kan alma ile elde edilen serumlarla aglütinasyon kompleman tespiti yapıldığında zamana göre aglütinasyon 1/40000 oranında doğru olarak görüldüğü gibi diğer prosedür de doğru çıkmıştır.

Bahsedilen miktarın yeterli olduğu kabul edilerek artık aşılama sonrası son verildi. Burada dikkate alınacak yön bu uygulama ile acaba beygir, dana ve merkep ruam basiline karşı bağışıklık kazandı mı, diğer bir deyişle bu hayvanların serumları, koruyucu bir kabiliyete ve iyileştirici bir özelliğe sahip midir? Sonuçta bu hayvanlara çeşitli şekillerde ruam basili verildikten sonra ruam bulaşıcı mikrobik hastalığına organizma dayanıklılık gösterecek miydi? Bunun için iki yol seçildi. Birincisi beygir, merkep ve danadan kan alınarak ayrı ayrı serumlar üretildi. Bu serumlar ile

küçük deney hayvanlarına ruam basilini içeren enjeksiyonlar yapıldı.

(L) Markalı Kobaylar

1. Üç kobay alındı. Birinci kobayın cilt altına beygirden alınan 20 cm³ serum verildi.
2. İkinci kobaya merkepten elde edilen serum, üçüncü kobaya ise danadan alınan serum 20'er cm³ olarak verildi.
3. Bu üç kobaya 24 saat sonra 48 saatlik et suyu kültüründen canlı ruam basili cilt altına ¼ cm³ enjekte edildi.

Sonuçlar:

- A. Beygir serumu ve 24 saat sonra kültür alan kobay aşılama 8 gün sonra öldü. Kadavrada aşı bölgesi civarındaki dokuların kalın ve sert olduğu, basınç uygulandığında ise peynirimsi irinin mevcut olduğu görüldü ve bu irinden yapılan analizden gerçek ruam mikrobu elde edildi.
- B. Merkepe serumuyla aynı usule tabi kobay, kültür verilmesinden 12 gün sonra öldü. Otopsisinde iç organlarda küçük ve büyük ruam hasarı ve bu hastalığın merkezlerinde basilin varlığı ortaya kondu. (Sayfa 15)
- C. Dana serumuyla aşılama kobay da mikrop verilmesinin 10. gününde öldü.

(M) Markalı Kobaylar

Bağışıklık oluşturmak amacıyla enjeksiyona tabi tutulan bu büyük hayvanların serumlarıyla ruam basili aşağıdaki yöntemle kobaylara uygulandı. Yine üç kobay alınarak bunlardan birincisine beygir serumundan cilt altına 20 cm³ aynı zamanda hayvanların diğer tarafından ¼ cm³ canlı ruam basili verildi. Aşılama 12 gün sonra testisler iltihaplanmaya başladı. Hayvan 28. gün de ruamdan öldü.

Diğer kobaylardan birine merkepe diğerine dana serumlarından beygirden olduğu gibi cilt altına 25'er cm³ ve diğer taraflarına da canlı ruam basili verildi. Deney hayvanı aşılama 9 gün sonra, dana serumuyla mikrop enjekte edilen kobay ise 15 gün sonra ruamdan öldü. Bunlardan dana serumuyla birlikte basil alan kobayın otopsisinde daha belirgin bir tahribat vardı. Kobaylar üzerinde yapılmış olan bu aşılama sonrasında şekillenen ölümün hakikaten ruam mikrobundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını öğrenmek için kontrol bir kobay deneye dâhil edildi. Buna yalnız ruam basili verildi. Enjeksiyonun 28. gününde bu hayvan da ruamdan öldü.

(N) Markalı Kobaylar

Bu deney hayvanları üzerinde aşağıdaki gibi aşılama deneyi yapıldı:

1. 20 cm³ beygir serumu ile 5 cm³ basil sıvısı karıştırılarak bir kobayın karın zarı içerisine enjekte edildi.

2. Üç gün sonra 35 cm³ serum ve 10 cm³ yine basil sıvısı birlikte tekrar aynı kobayın karın zarı içerisine enjekte edildi. Yani bu suretle karma bağışıklık usulü prosedürü uygulandı.
3. Dört gün sonra ruam basilin et suyu kültüründen bu hayvanın cilt altına ¼ cm³ enjekte edildi.
4. Kültür verilmesinden 12 gün sonra bu kobay öldü.
5. Diğer bir kobaya 24 cm³ basil sıvısından karın zarı içine verildi. 48 saat sonra bağışıklığa tutulan merkepe serumundan 15 cm³ alındı ve bu serum içerisine canlı 0,5 cm³ ilave edildi. (Sayfa 16)
6. Serum ve mikrop karışımı 37 derecelik etüvde bir saat bırakıldıktan sonra bu karışım kobayın karın zarı içerisine enjekte edildi. Bu aşılama 10 gün sonra kobay ruamdan öldü.

Bağışıklık merkepe serumuyla sağlam merkepe üzerinde deney

Ölü ruam basili ile bağışıklık verilmiş olan merkepe serumunun, bağışıklık özelliği hiçbir enjeksiyon işlemine uğramamış olan bir merkepe üzerinde ruam basili ile beraber deney:

İşlem aşağıdaki sırayla takip edildi:

1. Elimizde esas olan merkepten kan alma ile serum elde edildi.
2. Bu serumdan sağlam merkepe her gün 100'er cm³ cilt altına verilmek üzere beş gün boyunca aşılama yapılarak toplam 500 cm³ serum enjekte edildi.
3. Son enjeksiyondan 24 saat sonra merkebin cilt altına basilin et suyu kültüründen ¼ cm³ oranında enjekte edildi.
4. Üç günlük bir kuluçka süresinden sonra basil verilen bölgede geniş bir ödemin oluşması ve hayvanın genel durumunun bozulması gibi ruamı gösteren belirtiler görüldü ve bir hafta içinde merkepe, ruam hastalığından öldü.

Şimdi esas olarak ölmüş basil aşılama ile bağışıklık oluşturulan merkepe ile beygir ve dananın serumlarıyla, özetle arz edilen deneylerden doğru bir sonuç çıkmadı. O halde beygirle merkebin canlı ruam mikrobuna karşı gösterecekleri dayanıklılık veya hassasiyeti gözden geçirelim:

- a. Merkepe sindirim organları yolu ile ruam basili verildi. Mikrop verilmesinden 9 gün sonra hayvan genel ve özel olarak açık bir şekilde ruam belirtileri göstererek öldü. Bunun gözle ve mikroskopla incelenebilen yıkımı patolojiye gönderildi.
- b. Beygir ise ölümünden evvel yani uzun müddet ölmüş basil aşılama sonrasında canlı mikrop almadan önce Mallein testine tabi tutuldu ancak test sonucunda pozitiflik görülmedi. Devamında bu hayvana da burun mukozasına sürtünme ve cilt altına az aşılama suretiyle canlı basil verildi. Bir müddet sonra beygir ruam belirtisi göstermemesine karşın

olası bulaşma (*Sayfa 17*) riskine karşı öldürülüp otopsi yapılmış olup bu iki hayvanın iç organları patoloji uzmanı tarafından incelendi.

Ruam bulaşıcı mikrobik hastalığına karşı hassas, hassas olmayan birçok hayvan üzerinde yapılan deneylerden anlaşıldı ki: ruam basiline karşı organizmada bağışıklık verici bir maddenin oluşması mümkün olamıyor. Buna sebep olarak yukarıda da ifade edildiği gibi bu mikrobu çeşitli suretler ile kuşatma ve imhaya mahsus koruyucu işlemlerin oluşturulmasına hizmet eden hususi dokuların bizzat ölmüş dahi olsa ruam basili karşısında karşı koyacak unsurların tamamen bozulması ve mukavemet edememesi gösterilmiştir. Şu halde bakteriyoloji yazarlarından meşhur isimler de dâhil olmak üzere köpek, kobay vs. hayvanları ölmüş veya canlı ruam mikrobuna karşı bağışık yaptıklarına dair ileri sürülen görüşler işin temeli esasına pek de uygun olmasa gerek. Bununla beraber şurası da yazılmaya değer ki aynı ruam basilinin ölmüş kültür sıvısından cilt yoluyla verilmesiyle eşit miktarda ve dört litre kadar yüksek dozda aşıladığımız merkep ile beygirin canlı kültür verilmesi suretiyle birinin ölü ve diğerinin öldürülmesi sonrasında her iki hayvanın otopsi sonuçları bize oldukça farklı sonuçlar göstermiştir: Merkepte ölmüş ruam basilinden doğan ve bazı organların önemli kısımlarının hayattan uzak denilecek surette katılma ve kireçlenmeye, pek çok zorlukla kırılan yara kabuklarına karşı beygirin iç organları o kadar mühim ve dikkate değer bozulmaya uğramamış olmasıdır. Şu kıyaslamadan elde edilen kanaat beygirin ölmüş ruam kültürü enjeksiyonundan fazla etkilenmediğini gösteriyor ki bu da deneyin beygir üzerinde tekrarını talep ediyor ise de bu da zaman ve mesai meselesidir.

Danada deneyler

Daha önce de aktarıldığı üzere deneye bir de dana eklenmiş idi. Bundan dolayı burada dana üzerindeki uygulamalardan bahsedeceğiz. Bu hayvana ölmüş ve canlı ruam mikrobi aşılmasından amaç şuydu: normal olan yayılmaya karşı, ruam bulaşıcı mikrobik hastalığına karşı hiçbir suretle yakalanmayan binek hayvanlarının organizması, sun'ı aşılama ile belirli bir düzeyde ve kesin bir antikor oluşturabilecek mi? İşte bu doğrultuda diğer deney hayvanlarında olduğu gibi ruam basilinin öldürülmüş kültüründen cilt altına ve damar içine yapıldı. Bir seneden fazla süren aşılama sonrasında uygulanan miktarın toplamı dört litreyi geçmişti. (*Sayfa 18*) Bu aşılamanın seyri esnasında çeşitli zamanlarda serolojik tanı usulüyle serumun nitelikleri incelendi; ilk devrelerde aglütinasyon reaksiyonu ancak 1/1500 oranında görüldü; kompleman tespiti işleminden sonuç elde edilemedi. Bir süre sonra tekrar yapılan Aglütinasyon tecrübeleri 1/40000 oranına kadar çıktı. Sonradan bu teamül olumsuz sonuç verdiği halde kompleman belirti işlemi olumlu sonuç verdi.

Antijen aşılmasının durdurulmasından 15 gün sonra danadan kan alınarak serum elde edildi. Bu serumun koruyucu özelliğini incelemek amacıyla kobaylar

üzerinde ruam basili ile birlikte aşılama deneyleri yapıldı.

1. Sağlam kobayın cilt altına bu serumdan 20 cm³ enjekte edildi.
2. 24 saat sonra canlı ruam basilinin et suyu kültüründen ¼ cm³ yine bu kobayın cilt altına verilerek gözlem altına alındı.
3. Aşılamanın üçüncü gününde hayvan ruamdan öldü. Aşı noktasında oluşan iltihaptan yapılan kültürde ruam mikrobi tespit edildi.
4. Aynı zamanda diğer sağlam bir kobayın cilt altına bir taraftan dana serumu ve sonrasında diğer taraftan yine canlı ruam basilinden enjekte edildi.
5. Bu kobay da serum ve mikrop enjeksiyonundan 15 gün sonra öldü. Bu hayvanın iç organlarında ruam yıkımının daha yaygın olduğu, karın zarı üzerinde oluşan büyük bir çibandan yapılan kültürde ise saf ruam basillerinin varlığı görüldü.
6. Bu iki kobaya ek olarak bunlara gözlemci olacak üçüncü sağlam kobaya, diğerlerine verilen miktarda, serumsuz olarak yalnız basil aşılandı.
7. Gözlemci amacıyla kullanılan kobay 28. günü ruam bulaşıcı mikrobik hastalığından öldü; otopsisinde ruam tahribatı oldukça fazlaydı.

Görülüyor ki ruam antijeni ile bağışıklık kazandırılmış olan dana serumuyla kobay üzerindeki sonuçlar olumsuz çıkmıştır. Serum ve kültür enjeksiyonuna maruz kalan iki kobay aynı günde aynı canlı ruam kültürü ile aşılana üçüncü ve gözlemci kobaydan daha önce ölmüşlerdir. Şu halde kısa bir süre için de olsa, dananın serumu kobayları ruam bulaşıcı mikrobik hastalığından korumuş oluyor.

Elimizdeki ruam kültüründen aynı zamanda üç kobaya aynı miktarlarda aşılama yapıyoruz. Bunlardan serumla beraber kültür alan birinci deney hayvanı 10 gün, yine serumla birlikte kültür alan ikinci hayvan 15 günde, serumsuz yalnız kültür enjekte edilen kobay ise 28 günde ölüyor. Şu hal karşısında bir soru (*Sayfa 19*) hatıra geliyor, bu üç kobayın ölüm müddetleri arasındaki fark nedendir, acaba üç hayvanın aynı ruam mikrobuna karşı çeşitli derecede bireysel bir hassasiyeti sonucu mudur?, yoksa aşılama ile bağışıklık sağlanması sonucu organizmasından hastalığı önleyici ve iyileştirici bir özellik beklediğimiz dana serumu aksine bir ve iki numaralı kobayların organizmasını daha hassas kılarak aşılana ruam basillerinin daha hızlı sürede hastalık oluşturmasına zemin mi hazırladı. Her iki fikir akla gelebilir ise de ikinci ihtimal daha kolaydır. Çünkü önceki deneylerde görüldü ki bağışıklık kazandırma işlemine tabi olan beygir ve merkep serumlarıyla beraber basil alan deney hayvanlarının kısmen gözlemcilerine oranla daha önce öldükleri görülmüştü. Demek oluyor ki bu hastalığı önleyici ve iyileştirici özelliklerinden faydalanmak istediğimiz bu serumlar aksine deney hayvanlarının organizmasını daha hassas kılıyor. Ruama hassas hayvanların olumsuz sonuç vermesi gibi ruama

dayanıklı sığır cinsinden olan hayvanın serumlarının da hiçbir vasıfları içermediği görüldü. Bir de sığır cinsinde olan hayvanlara canlı ruam basili aşılması hastalığının belirtileri ve durumu açısından ne sonuç verecek, bunu incelemek amacıyla esas dana ikinci bir deney aşamasına tabi tutuldu. Şöyle ki: Ruam basilinın gliserinli jelöz üzerindeki sekiz saatlik kültürü fizyolojik su ile istenilen bir oranda karıştırıldı.

1. Öldürülmeksizin doğrudan doğruya bu canlı kültür karışımından 27 Mart 1926 tarihinde dananın cilt altına 5 cm³ zerk edildi. Bu zerk sonrasında aynı günler içerisinde hayvanda normal olmayan bir hal görülmüştü. 24 saat sonra yalnız aşılama noktasında 8 cm büyüklüğünde ve elle muayene edildiğinde sert bir şişme meydana geldi ve 20 gün kadar bu halde kalarak iltihaplanmaksızın kayboldu.
2. 4 Nisan 1926'da bu karışımdan yine cilt altına 25 cm³ verildi. Bu enjeksiyondan sonra deneme amacıyla 20. saatte kan frotisi yapıldı ve mikroskop muayenesinde fagositoz görülemedi. Lökositlerin oluşumunda az çok bozulma gözlenirken, protoplazmaların pek değişiklik göstermediği belirlendi. İlk aşılama enjeksiyon noktasında 24 saati müteakip şişkinlik meydana geldiği halde bu defaki bir hafta sonra küçük olarak meydana geldi, kısa zamanda kayboldu.
3. 11 Nisan 1926 tarihinde yine canlı kültürden 50 cm³ cilt altına verildi. Bu enjeksiyondan bir buçuk saat sonra hayvanın normalden farklı olarak sırt kaslarının titrediği, beraberinde nefes darlığı ve ızdıraplı bir durumda olduğu görüldü. Zorlukla ayağa kaldırıldığında genel durumu bozuk, iştah tamamen kapalı idi. Bu hal dört saat kadar devam etti. Bunu müteakip (*Sayfa 20*) genel durum özetle; iştah normal seyrine döndü. Bu aşılamanın yedinci günü kan alma ile elde edilen serumda 1/2000 oranında yapışma teamülü görüldü.
4. 20 Nisan 1926'da canlı kültür karışımından ve bir uygulamada 70 cm³ damar içine enjekte edildi. Enjeksiyondan 4-5 saat sonra solunum sayısının 50-60 arasında olduğu ve genel durumunun pek vahim olduğu görüldü. İkinci gün iştahsız, genel durumu pek güçsüz ve perişan olmakla beraber zayıflık belirtileri baş gösterdi. Kalan günlerde aynı belirtiler görüldü, özellikle zayıflık ileri bir hal aldı. Hayvan gıdaya karşı kayıtsız, çoğunlukla yatmakta, nadiren ve zorlukla ayağa kalkmaktaydı. Damar içine kültür enjeksiyonunun 16. günü kan alındı. Kan serumuyla yapılan kompleman tespiti işlemi tamamen olumlu sonuç verdi. Yine bu enjeksiyonun 16. günü damardan şırıngaya çekilen kan hemen o esnada kobayın cilt altına 1,5 cm³ miktarında verildi. Bu uygulamadaki amaç dananın kanında ruam basillerinin mevcut olup olmadığını incelemektir. Bu suretle aşılama ile gözlem altına alınan kobay 55 gün sonra öldü. Kobayda dış bakıda bir şey olmadığı gibi karın boşluğundaki bütün iç organlar normaldi.

Çiğerlerin biri kanlanmış ise de bu da geçici ve önemsizdi. Ruam hastalığını gösterecek tahribat olmamasına rağmen iç organlardan yapılan kültürlerde saprofit mikroplardan başka bir mikrop görülmedi. Kobayın ölmesi ise sıradan sebeplerden meydana gelmiştir.

5. 23 Mayıs 1926 tarihinde damar içine yalnız 40 cm³ canlı ruam basili enjekte edildi. Enjeksiyondan yarım saat sonra damardan kan alındı. Mikroskop muayenesinde lökositler içerisinde fagosite olmuş tek tük ruam basilleri gözlemlendi. Bu enjeksiyonun 24. saatinde dananın damarından şırınga ile çekilen kandan kobayın cilt altına 2 cm³ verildi. İki ay gözlem altında tutulduktan sonra ruama ait bir şey görülmemesinden dolayı serbest bırakıldı. Sonra başka deneyde kullanıldı ve öldü.

Özetle: İki ay içerisinde cilt altı ve damar yolu ile danaya aşılana canlı kültür miktarı 280 cm³'tür. En son zerkten 10 gün sonra danadan kan alınarak serumu ayrıldı. Elde edilen bu serumdan erkek kobayın cilt altına 20 cm³ diğer bölgeden ¼ cm³ canlı basil kültüründen verildi. Kobay aşılama 25 gün sonra öldü. Otopsisinde testisler, karaciğer, dalakta özellikle karın boşluğunda oluşmuş çıban gibi açık, ilerlemiş ruam hastalığı afetleri görülmüyordu. (*Sayfa 21*) Bu bozulmanın mikroskop ve kültür muayenelerinden ruam basilleri gözlemlendi. Şu halde canlı basil aşılması ile elde edilen dana serumu bu defa da kobayı ruam bulaşıcı mikrobik hastalığından koruyamadı. Burada incelemeye zemin oluşturan diğer bir durum varsa o da ruam bulaşıcı mikrobik hastalığına doğal olarak dayanıklı ve dirençli bulunan sığır cinsi hayvanlardan 280 cm³ canlı kültür aşılama bu dananın ruamlı olup olmayacağı durumudur. Canlı kültür aşılmasına başladıktan bir süre sonra dananın testislerinin doğal olmayan büyük şişkinlik ve görünüm üç dört misli bir hacimde olması dikkati çekmekte ve elle muayene edildiğinde az-çok hassasiyet, bölgesel sıcaklık mevcuttu. Özetle testislerde kronikleşmiş bir iltihaplanma başladı. Aynı hal iki buçuk üç ay devam ettikten sonra testislerin alt kısımlarında da iltihap görüldü. Bu iltihabın kültüründen ruam basilleri elde edildi. İltihaplanmadan sonra önceden testislerde mevcut olan irilik yavaş yavaş çözülmeye yüz tutmuş ise de testislerin dışarıya açıldığı 4 Temmuz 1926 tarihinde dananın öldüğü, diğer işlemler ise 4 Şubat 1927 tarihine kadar yedi ay boyunca küçük miktarlarda devam etti. Dana ölmeden 40 gün önce yine bu iltihabın kültüründe yalnız ve saf olarak ruam basilleri oluşmaya başlamıştı. Bu deneye tabi tutulduğu andan aşılama kadar hiçbir sebeple dışarıya çıkarılmayan hayvanın bulunduğu yerin zemini sık sık kireç vesaire maddeler ile temizlenmiş ve iltihaplanmanın devam ettiği sürece farklı bir hastalık belirtileri görülüp görülmediğini belirlemek amacıyla hayvan takip edildi. Fakat zikredildiği üzere testislerin tahribatından başka dâhili ve harici hiçbir klinik belirti gözükmezsizin hayvan öldü.

Sığır cinsi hayvanlara devamlı ve fazla miktarda ruam kültürü aşılması neticesinde haricen yayılmış sivilceler tarzında kırmızı cilt lekeleri ile birlikte kronik ruamın belirtileri dışında yalnız testislerin tahribatı görüldü. Dananın otopsisinde ortaya çıkarılan hastalık tahribatı ile ilgili bulgular patoloji laboratuvarınca incelendiğinden burada izahtan kaçınılmıştır. Şu kadar ki otopside görülen lenf yumruları ve iltihaplı deri kısımlarının kültürü yapılmış, elde edilen saf kültürün kobaya aşılması da ruam aşısı yerine geçmiştir.

Özet: Ruamın beyan edilmiş şartları dâhilinde tedavisi hayvanın aşısı ve serum gibi maddeler ile korunması mümkün görülüyor. Fakat fen ilmindeki ilerlemelerle de faydalı bir neticeye ulaşmak fazla uzak sayılmaz. İkinci olarak ruamın normal yayılımına karşı koyan ve dayanıklı (*Sayfa 22*) bulunan sığır cinsi hayvanın deneysel ruam bulaşıcı mikrobik hastalığının avucuna düştüğü dana üzerindeki art arda gelen uygulamalar ve işlemler ile açıkça ortaya koyulmuştur.

Fen kurbanı Muallim Bakteriyolog Binbaşı Ahmet Bey çok zor şartlar içinde son derece tehlikeli canlı kültürler ile bu deneylerini ruama karşı aşısı ve serum bulmak üzere halen laboratuvarında başyardımcı olan Yüzbaşı Akif ve Uzman Muavin olup halen Paris Pastör Enstitüsünde incelemesini ve uygulamasını tamamlayan Yüzbaşı Sadık Beylerle adeta aziz canlarını fen uğrunda ilim yolunda küçük görürcesine ortaya koymuşlardır. Memleketimizde ilk defa olarak uygulamaya konulmuş olan bu deneylerin faydalı sonuç vermemesine rağmen adı geçenlerden Ahmet Bey yine başlangıçta ilk olarak bahsettiğimiz ümitsizlik ve bıkkınlığa düşmeyerek bile bile felaket kurbanı olduğu yardımcısı Hüdaî Bey'le pek gizli tuttıkları usullerle tekrar başlamışlarsa da karşılığını göremeden şehit olmuşlardır. Bu deneylerin sonunda şehitlerimizin namının yücelterek beraber meslek aşkı, ilim fedakârlığı gösteren Yüzbaşı Akif ve Sadık Beylerin de isimlerinin zikrini boynumuzun borcu olarak gördük; bundan sonraki araştırmalar, uygulamalar okulumuzun patoloji laboratuvarına aittir.

Ek: Ruam tedavi edilebilir mi? Deneylerin patoloji açısından incelenmesi

Bu inceleme okulumuzun patoloji laboratuvarınca yapılmış olup dört kısma ayrılmaktadır: Birincisi bağışıklık vermek için uğraşılan tavşan ve kobayların bozulmasının genel inceleme neticesi; ikincisi bağışıklık kazandırmaya uğraşılan merkebin felaketinin incelenmesi; üçüncüsü yine bağışıklık meydana getirmek için deneye sokulan beygirlerin felaketlerinin incelenmesi; dördüncüsü ise danada deneysel ruam tahribatının büyük ve mikroskobik sonuçlarının değerlendirilmesidir.

Üç kısmın dokusal incelemesi, halen ikinci fırka 12. Topçu Alay Serbaytarı eski Teşrih-i Marazî Baş Muavini Binbaşı Alaaddin, dördüncü kısım ise Almanya'da uzmanlığını tamamlayarak yurda dönen Muavin Baytar Doktor Yüzbaşı Üveys Mazhar Bey

tarafından yapılmıştır. Dördüncü kısım Baytar dergisinin birinci külliyatında yayınlanmıştır.

(*Sayfa 23*) 1. Bağışıklık vermek için uğraşılan tavşan ve kobaylarda ruam tahribatı

Bu inceleme bakteriyoloji laboratuvarınca deneye konulan gruplardaki küçük hayvanların hepsinin sonuçlarının patoloji laboratuvarına verilmemesinden dolayı tam değildir. Özellikle açıkça belirti gösteren bir tavşanda yapılmış, bu baz alınarak diğerlerinde de sonuç aşağı yukarı aynı olmuştur.

A. Makroskobik sonuçlara dair açıklama

Karın zarı içerisine aşılama: Aşısı noktasında deride ısı artışı ve karın zarının yoğunluk kazanması. Cığerler: Kanlanmış, bazı noktalarda kanama ve morarma, darı büyüklüğünde ve fındık ebatlarına kadar değişen miktarda ruam yumrucukları, karaciğer soluk renkte, dağınık halde nekroz noktaları, koyu kanlanma ve pişmiş bir manzara.

Dalac: Solgun renkte ve daha az miktarda dağınık halde nekroz noktaları, koyu kanlanma.

B. Mikroskobik sonuçlara dair açıklama

Cilt: 1- Deride: Derinin en üst tabakasında önemli bir şey yoktur. Yalnız bazı noktalarda keratin hücrelerinin iflas etmesinden dolayı aşınmalar mevcuttur. Siyah kılların pigment tanecikleri mevcuttur.

2. Alt deride: Yumuşak tabakada bağ doku çoğalmış, kılcal damar iltihaplanmasına rastlanmakta olduğu gibi ağ tabakasına doğru inen sızma rastlanmıştır. Bu sızma incelendiğinde, yuvarlak hücreler ve epitelimsiler ve lenfositlerin birikmesinden ibaret olduğu anlaşılmıştır. Sızma ağ tabakaya indikçe artmakta olup bazılarının etrafında kırmızı kan küreciklerinden oluşan kanlanmaya hücreler arasında rastlanmakta olup bu da sarımtırak renkte olmasıyla sızmadan farklıdır. Sızmaya yakın bazı noktalarda ise kırmızı kan hücreleri ile dolmuş kılcal damarlara rastlanmaktadır.

3. Dalac kısmen nekrozlu, soluk renkte ve kısmen embriyo koyu renkte olmak üzere çeşitli bölgelerde görülmesinin yanı sıra damarların oldukça dolu olduğu görüldü, bazı noktalarda hücreler arası kanlanmalara rastlandı.

4. Karaciğer yaygın bir halde nekroza uğramış, soluk renkli kısımlarda birçok kanamalar ve hücresel sızıntı ile hücrelerin artması olarak iki farklı belirti görülmüştür. Bilindiği üzere bir ruam tüberkülü, deride dıştan içe (*Sayfa 24*) doğru eklenmiş halesi, yuvarlak hücreler ve epitelimsi tabakası ile peynirimsi maddeden oluşmuştur. Bazen büyük hücreler bulunur. Başlangıçta hücresel sızma yani lenfositler başlar, sırasıyla oluşumunu tamamlar. Bunun için doku muayenesinde bazı noktalarda hücresel sızmaya rastlandığı gibi tüberkülün oluşumuna göre asıl madde hücresel sızma ile birlikte bağ doku halesi ile peynirimsi maddeden oluşur; peynirimsi maddesiz eski tüberküller de ise eklenmiş bağ doku halesinin yoğunluğu ve hatta nadir durumlarda sertleşme de görülür.

Bahsi geçen hayvandan elde etmiş olduğumuz sonuçlar aşağıdaki gibidir:

1. Yumruların tarz ve oluşumlarında hayvan cinsinin etkisi vardır. Beygirdeki ruamın yumrulu dokuları gibi dokulara rastlamak tavşanda zordur. Şu halde görülen yumrular ruam özellikleri taşımakta ancak dokusal olarak ruam özellikleri taşımamaktadır.
2. Deneysel ruamlarda nekroz fazla olup bu da çoğunlukla karaciğer ve dalakta yer almaktadır. Ciğerlerin tahribatı sekonderdir. Burada amacımız ruamı normal seyirinin dışına çıkarmak değildir. Zaten bu ruamlarda yumrucuklar oluşmaz. Basit bir kanlanma ile ciğer, karaciğer ve dalak kanamasından başka bir şey görülmez.
3. Önemli tahribat ve az-çok organizmanın niteliğini gösterdiğinden dolayı deneye konulmuş olan usullerle hayvanlara da bağışıklık kazandırmanın imkânı yoktur.

2. Bağışıklık kazandırılmaya uğraşılan merkebin iç organlarının ve dokularının tahribatı

A. Makroskopik sonuçlara dair açıklama

A1. Bronşların içerisinde hastalıktan dolayı fazlaca irin, sümüksü zar üzerinde küçük damarların fark edilebilir şekilde damarlaşması, bazılarında kanlı morarmalar görüldü. Ciğerin sağ ve sol yarısından fazlası sertleşmiş olup bronş kılcalları dolgundu. Çeşitli yerlerinde nohut ve fasulye büyüklüğünde, etrafında bağ doku lifi son derece katılaşmış ve bazılarının içi kireçlenmiş tüberküller mevcuttu. Bazı noktalarında ufak kanama bölgeleri vardı. Adeta ruam sınırının başlangıcını gösteriyordu. Tüberküllere kesi yapıldığında kireçlenmiş olanların ortasında peynirimsi madde yoktu. Kısmen kireçlenmiş veya kireçlenmeden uzak olanların ortasında ve etrafında çeşitli maddeler mevcut olduğu gibi peynirimsi madde bazı noktalarda sertleşmiş, ciğer kısımlarını ıslatmıştı. Bazı kısımlarda ise ıslanmış madde yeşilimsi sıvıdan ibaretti. Ciğerin sol yarısının üst kısmına doğru amfizem mevcuttu. Göğüs zarı kısmen kalınlaşmış (*Sayfa 25*) bir litre kadar kanlı ve yeşilimsi sızmış madde ile doluydu. Ciğerin bazı noktalarında melanie tanecikleri mevcut idi. Bazı noktalarda ise kanamadan doğan morarmalar bulunuyordu. Bronş kılcalları sızmış madde ile kaplıydı. Kalp zarı boşluğu haricinde az miktarda yeşilimsi kanlı madde mevcut ve kalpte yazılmaya değer hiçbir şey yoktu. Kaba lenf bezlerinin bir kısmı sıkışık ve hepsi, peynirimsi maddeden arı, bir kısmı sıkışık olmakla birlikte göğüs zarının merkezi ve bazı kısımları kanlanmış, koyu renkte ve çamurumsu kıvamdaydı. Kanallar göğüs boyunca sıkışık ve lenf damarları dolu ve belirgindi.

A2. Karın Boşluğu

Peritonda yazılmaya değer bir şey yoktu. Karaciğer hacimce biraz büyümüşü. Yağlanma ve sığlaşma hali mevcuttu. Çeşitli kısımlarda kanama noktaları, kireçlenme, yarı kireçlenme, nohut büyüklüğünde tüberküller görünüyordu. Fakat altı adet tüberkül olup ciğerlerinkinden az sayıdaydı. Glisson muhafazası kalınlaşmıştı. Dalak azıcık büyümüş, kanama noktaları oluşmuştu. Pankreas, lobları arasında bağ dokunun kalınlaşmasından dolayı katılaşmış ve yüzeyinde birkaç adet dut şeklinde kireçtaşına rastlandı. Bağırsaklarda

yazılmaya değer bir şey yoktu. Yalnız periton kıvrımı boyunca lenf damarları dolu olmasının yanı sıra lenf bezleri sıkışık ve neredeyse peynirimsi, koyu renkli, kanlı ve çamura benzer kıvamdaydı. Böbrekler: böbreğin zarı son derece kalınlaşmış, böbrek dokusunda bağ dokusu oluşmuş, kesilen böbrekler kanamalı ve başkalaşmıştır.

B. Mikroskopik sonuçlara ait açıklama

1. Bronş kılcalları iltihabı ve dokusunun tahribatı, 2. Karaciğer iltihabı ve dokusunun tahribatı, 3. Bağ doku köklerinin arasının kalınlaşması ile loblar arası akciğer yangısı manzarası, 4. Dokular arası kanama, 5. Nispeten sağlam ciğer dokusu ile hem kenarından sızan yeşilimsi sıvının karaciğerin içine doğru nüfuzu ve ortalarında bağ dokusu ve epitel hücrelerin artması, ölü ve sağlam akyuvarların varlığı, 6. Bronşların sızan madde ile dolması, bazı noktalarda bronş yırtılması, 7. Bazı bozulmuş doku içerisinde yeşilimsi sıvı maddesi ve eser miktarda hücreler ve elyaf parçaları, 8. Bazı noktalarda ciğer amfizemi ve dokunun tahribatı, 9. Bazı noktalarda mallei granüllerinin sızmış olduğu (*Sayfa 26*), 10. Bazı noktalarda kanama eserleri, 11. Akciğer zarı yangısı ve bölgesindeki dokunun tahribatı.

Tüberküllere gelince: 1. Etraf kesif bağ dokusu halesi ve merkezi yuvarlak hücre ve lenfe benzer oluşan tüberkül, 2. Etrafı son derece kesif elyaf bağının soyulması ile yayılma merkezi az miktarda yuvarlak hücreler ve lenfe benzer oluşan tüberküllerden farklı, 3. Bazı tüberkülün peynirimsi madde ile parçalanması, lenf bezleri de aynı dokusal vasıflardaydı.

Karaciğer: 1. Glisson muhafazasının kalınlaşması ve içeriye bağ lifi salıverilmesi, 2. Karaciğer loblarının bağ doku ile parçalanması ve bundan dolayı kronik iltihaplanma görülmesi, 3. Karaciğer hücrelerinde yağlanmaya dönüşümü, çekirdekler tamamen ve kısmen kaybolmak suretiyle nekrozun fazlalığı, 4. Kanama noktaları mikroskopik özellikleri, 5. Tüberküllerin özellikleri, tüberküller başlığı altında aktarıldığı gibidir.

Dalak: Kanama noktaları, nekrozlanma, lobların kısmi kalınlaşması.

Pankreas: Langerhans kasları etrafında bağ dokunun kalınlaşması ve pankreas hücrelerinin körelmesi ve hücre ölümleri, 2. Kireçlenmiş bölgeyi kuşatan noktalarda aşırı derecede yoğunlaşmış bağ doku.

Böbrekler: 1. Böbrek muhafazasının kalınlaşması, 2. Muhafazaya yakın noktalarda epitel hücrelerin ve lenfoma kümelerinin varlığı ve muntazam olmayan surette bağ doku halesiyle kesilmesi, 3. Muhafazanın böbrek ana dokusuna bağ hatlar salıvermesi, 4. Böbrek ana dokusunda hücre çürümesinin varlığı, kılcal damarların dolması ve bazılarının yırtılmasıyla kanın hücresel unsurların arasına yayılması.

Kısaca doku hakkında görüşleri yukarıda olduğu gibi arz ettik. Tüm tahribatlar önemli bulgulardır. Şimdi tahlil edelim.

Hayvana deney boyunca önce ölü basil verilmiş ve sonra ölmeden bir süre önce sindirim organları yolu

ile canlı basil verilmişti. Şu noktayı da tahliller ile ilgili görüşlerimize esas olacağı yönüyle göz önünden uzak tutmayalım. Aynı zamanda yazarları da dâhil edelim. (Sayfa 27) Yazarlara göre, merkeplerde ruam haddinden fazla çok şiddetli ve uzun süreli; şu halde görülecek tahribat sınırlı akciğer kanaması ve lenf bağlarının dolması, lenf ödeminden ibarettir. Ender ve müstesna vakalarda ancak darı büyüklüğünde olmak üzere adedi pek sınırlı darıya benzer ruam tüberküllerinden ibarettir. Bronşit ve zatürree belirtileri görülür.

Yine yazarlara bakılırsa ruamın uzun süreli olarak seyrettiği hayvanlarda ruam tüberkülleri kireçlenir ise de hacimce darı büyüklüğünü pek geçemez. Şu halde merkeplerde ruam uzun süreli olarak koruyucu halde bulunamaz. Bundan dolayı nohut, fasulye ve fındık büyüklüğündeki kireçlenmiş tüberküller nereden doğuyor? Malumdur ki ruam tüberküllerinden, koh (koch) basilinden, aktinomikozdan, parazitlerden, yabancı cisimlerden ileri gelir.

1. Ruam tüberküllerinin niteliği, bağ doku halesi, yuvarlak hücreler ve akyuvara benzer olarak büyük hücreler ve peynirimsi maddeden ibarettir. 2. Koh basili tüberkülü fazla miktarda büyük hücre, epiteliimsi hücre ve yuvarlak hücre bölgelerinden oluşmaktadır, 3. Aktinomikoz merkezi miçelyumlardan, etrafı yuvarlak hücreler ve lenfomik hücrelerden ibarettir. 4. Yabancı cisimler ve parazitlerden ileri gelenlerde büyük hücreler az miktarda yuvarlak ve epiteliimsi hücreler (eozinofil) ve genellikle kireçlenme ile nitelenmiştir. Yabancı cisim veya parazit mevcuttur veya parazit mevcut değildir.

Bundan başka büyük hücrelerin çeşitli tüberküllerde ayrı özellikleri vardır. En hacimli tüberkül, parazitler ve yabancı cisimlerden doğan tüberküllerdir. Fazlaca kireç görülür. Bazen kireç, tüberkülün bütün deri özelliklerini karıştıracak şekilde kuşatır. Mezbahalarda, ayrılan karaciğerde cevizden yumruğa kadar, kireç ile sızan parazit tüberküllerine rastlanmaktadır. Sırf ciğerlere özel olan parazit tüberküllerinin kendilerine mahsus özellikleri vardır. Şu halde merkepte evvelce parazit veya yabancı cisim mevcut olup tüberküller ondan mı ileri geliyor? Hayır...

Öncelikle parazit tüberkülleri özellikle karaciğerde, sekonder olarak akciğerlerde yer alır. Akciğerlere mahsus hususi özelliklerde ayca parazitlerden ileri gelen tüberküller de vardır. İkinci olarak, özellikler yukarıda ortaya koyulduğu şekilde değildir, bulunan karışık kireç kolayca yakındaki dokudan ayırt edilebilir.

Burada görülen tüberkül en fazla ciğerlerde ve pek sınırlı olarak karaciğerde yer almaktadır. Dokusal özellikleri, ruam tüberkülleri şeklindedir. Kirecin yerini gösterenler de hususi bir şekilde ruam dokusunu gösterirler. (Sayfa 28) Yabancı cisimden de (başak, kılçık, kıl vs.) değildir. Bunun eseri bile yoktur. Şu halde gördüğünüz tüberküller ruam tüberkülleridir. Tüberküllerin dokusal özelliklerine bakılırsa aynı ruam kireç taşına benzer tüberkülü gibidir. Farkı öncelikle

büyük olması, ikincisi kirecin çokluğu, üçüncüsü çoğunlukla ruam çıbanının merkepte bulunmasıdır.

Bu tezat ne ile izah edilecektir? Bu tüberküller nasıl meydana geliyor?

Canlı ruam basilleri gerek kılcal damarları tıkayarak fagositoz meydana getirmekle ve gerek toksik salgılaması suretiyle fagositoz üretmekle ruam tüberküllerini meydana getirsin varsayımlarına göre, ölmüş ve toksini içeren madde enjeksiyonu ile de ruam tüberkülleri neden meydana gelsin...

Birinci şıkka göre, ölmüş ruam basilleri lenf ve akciğer yumrularına geliyor; kılcal damarları tıkiyor, kanama meydana getiriyor, aynı zamanda fagositoz oluşturuyor. Yavaş yavaş tüberkül meydana geliyor. İkinci olarak karaciğere, dalağa, böbreklere ve diğerlerine gidiyor... Bunlarda aynı hal meydana geliyor. Bu bakımdan oluşan tüberkül ruam tüberkülü özelliğindedir. Fakat bir bulaşıcılık yoktur. Bunun için peynirimsi madde yoktur. Devamlı olarak seçilmiş noktaya, zerk suretiyle basiller yığılıyor iltihap belirtileri birbiri ardından geliyor. Tüberkül ihtiyarlıyor, kireçlenme başlıyor fakat bu ihtiyarlanma işinin devamlı olarak meydana gelmesi kronik ve doğal olarak seyreden vakalardan daha hızlı oluyor. Tabiatta kronik vakalarda görülenden daha büyük nohut, fasulye ve fındık büyüklüğünde tüberküller meydana gelmiş oluyor.

İkinci şıkka göre, toksin üzerine eklene eklene aynı hal meydana gelmiş olur. İşte uzun süreden beri ölmüş ruam kültürü aşılmasına maruz kalan merkepte doğal halinin aksine meydana gelen kireçli tüberküllerdir.

Yalnız şurası hatırlanmalıdır ki bazı tüberküllerde görülen peynirimsileşme hali neden meydana geliyor? Yukarıda ifade ettiğimiz gibi ölmüş kültürden sonra bu hayvana canlı basili içeren kültür enjekte edilmiştir. Doğal olarak madde virüslüdür. Ciğerler, karaciğer, dalak ve böbreklerin çeşitli bölgelerinde akut ruam tahribatı (kanama, hücre kümelerinin birikmesi) meydana gelmekle beraber, bazı tüberküller ruam basilinun belirgin özellikleri olarak peynirimsileşmiş, parçalanmış ve neticede bu tüberküller virüslü olmuştur, düşüncesi ile izah edilebilir mi?

En önemli olan tüberküllerin durumunu böylece tahlil ettikten sonra diğer tahribatlara gelelim:

A. Ciğerlerde ve bronşların dokusal tahribatında 1, 2, 3, 6, 11 numaralı görülen (Sayfa 29) ruam tahribatı, organın şişmesi, yabancı cisimler, parazitler ve diğerleri gibi hastalıklardan doğan ortak afetlerden sayılır. 4, 5, 7, 10 numaralı afetler ruam akut hasarlarından aynı canlı kültürün enjeksiyonundan doğan hasarların fark edilen oluşumlarıdır. 8 ve 9 numaralı hasarlar sekonder ve rastlantısaldır.

Tüberküllerden 1 ve 2 numaralı tahribatlar devamlı olarak ve uzun süreden beri enjekte olunan ölü basil ve toksinlerin virüssüz tahribatı, 3 numaralı tahribatta canlı kültürlü öncesinden meydana gelen tüberküllerin meydana getirdiği tahribattır.

B. Karaciğerde, böbreklerde görülen parçalayıcı tahribat, genellikle laboratuvarlarda deney hayvanına ruam, verem gibi kronik hastalık kültürlerinin enjeksiyonu ile meydana gelen durumla kıyaslanır. Böbreklerde embriyonik hücre kümelerinin birikmesi, canlı basil kültürlerinin enjeksiyonundan meydana gelir. Kılcal damarların dolması, bazılarının yırtılması aynı durumdan meydana gelir.

Sırası gelmişken kronik hastalıkların var olan salgıları içeren bezeleri bozacağını söylemiştik. Pankreasta görülen derin tahribat da bu iddianın açık bir delilidir. Yani ruama hassas olan merkepte bu vasıtalar ile tedavi elde etme veya bu hastalıktan korumaya inanmak pek de uzak bir durum değildir.

Bağışıklık kazandırmak için uğraşılan beygirde iç organların tahribatı

Beygirde makroskopik sonuçlara dair açıklama

1. Bronşlar içerisinde ufak hastalık belirtileri, sümüksü zarı üzerinde dolmuş dallanmalar ve küçük damarlar, bazılarında temiz kan kaynaklı kanamalı morarma mevcuttu. Sağ ve sol ciğerin neredeyse üçte biri katılmıştı. Bronş kılcalları dolgun bulunuyordu. Çeşitli yerlerinde ceviz ve fındık büyüklüğünde, etrafında bağ doku lifi son derecede kalınlaşmış kireç bağlama ile yayılmış tüberküller mevcuttu. Tüberküllerin merkezlerinde peynirimsi madde yoktu ve ciğerlerin tepesinde amfizem bulunuyordu. Göğüs zarı kalınlaşmış, 1,5 litreye kadar hafif kanlı, fibrinden arı seröz bir madde mevcuttu. Kalın lenf bezelerinin bir kısmının kireçli ve dolmuş, bir kısmının ise lifli olmasına rağmen tamamının peynirimsi maddeden arı olduğu görüldü.
2. Karaciğer oldukça geniş bir hacimde, sert kıvamda, dört beş adet fasulye büyüklüğünde kabarmış lifleri içermekteydi. Dalak biraz büyümüş, kanama noktaları ile (Sayfa 30) doluydu. Böbrekler bağ doku ile perdelenmiş, koruyucu lifi kalınlaşmış, böbrek bütünü biraz küçülmüştü.

Mikroskopik sonuçlara dair açıklama

1. Bronş kılcallarının iltihabı ve dokusal tahribatı, 2. Ciğer lobülleri arasında verem, 3. Karaciğer iltihaplanması, karaciğer sirozu 4. Kronikleşmiş böbrek iltihabı ve tahribatı.

Tüberküllere gelince: 1. Etrafı son derece kesif bağ doku halesi, bazılarında kabuklaşmış kireç 2. Lenfomik hücrelerin sızmasının bulunmaması.

Şu halde ruama tedavi, önemli organizma hasarları meydana getirdiğinden bunda da bu yol ile sonuç elde edilememiştir.

Danada deneysel ruam tahribatı

Bu kısım Tababet-i Baytariye Doktoru Teşrih-i Marazi Muavini (Veteriner Hekim ve Patoloji Yardımcısı) Üveys Mazhar Bey tarafından Derginin birinci külliyatı olarak yayınlanmış olduğundan oraya müracaat edilmesini tavsiye ederiz. Sadece sonuçları aktarıyoruz:

1. 3000 öldürülmüş, 280 canlı ruam basilini cilt altına ve damar içine vermek üzere şimdi mevzumuzu oluşturan dana aşırı kaşeksiden ölmüştür.
2. Otopside gözlemlenen büyükçe bozulma, her iki testis tarafının testis yanları uçlarında yer alan peynirimsileşmiş iki odak (ruam çıbanı) ile bunların dışarıyla olan bağlantısını sağlayan fistüllerinden, ciğerlerde hakiki olarak sabitleşen ve fakat gerçek ruam tahribatına nazaran yarım niteliksel şekil gösteren odaklar ile burun yolu sümüksü zarı üzerinde münferit yumrularından ibarettir.

Dokusal muayene: Ruam deneyinin dananın ciğerlerinde meydana getirdiği bozulmanın bronşit akıntısı ile beraber hücrelerin bozulması kokuşmuş zatürreli loblar ve bu odakların civar kısımlarında bir dokular arası akciğer yangısı görünümü meydana getirmişti. Yanı sıra burnun sümüksü zarı üzerindeki bezelerin de parçalara bölünmüş nüve ile muttasıf nekrozu bir merkez ile bunu yenileyen bir taneciklenme çerçevesinde oluşan vasıflandırılmış afetler ile ayırt edilen ruamdan ibaret olduğu meydana çıkmıştı.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmanın ana materyali olan ayrı basımın Askerî Tıbb-i Baytarî Mecmûa'da yayımlanan 3 ayrı çalışmanın birleştirilmiş hali olduğu, ayrı basımın 17. sayfasından itibaren sunulan patoloji sonuçlarına ait bölümün ilk üç yayında bulunmayıp düzenleme heyeti tarafından ayrı basıma eklendiğinin tespit edildiği bulgular bölümünde bildirilmiştir. Bununla birlikte ayrı basımın 12. sayfasındaki "Bundan dolayı patoloji laboratuvarının bu hususa ait değerlendirme ve incelemeleri sonradan yayınumıza ek olarak konulacaktır" bilgisi bulgular bölümünde sunulmuştur. Ayrı basımda üç ayrı çalışmaya ek olarak düzenleme heyeti tarafından eklenen patoloji bulguları bölümüyle Osman Nuri Eralp, Ahmet Bey ve Hüdâi Bey'in ruam ile ilgili çalışma sonuçlarının bir arada aktarılacak bütünlüğe kavuşturulduğu söylenebilir.

Ayrı basım ile ilgili olarak birkaç çalışmada (Anonim 1928, Dinçer 1969, Uçar 1969, Melikoğlu 2007) Osman Nuri Eralp, Ahmet Bey ve Hüdâi Bey'in ruam kültürlerinin öldürülmesi veya zayıflatılması esasına dayalı olan ve aktif bağışıklık sağlaması amaçlanan aşı ve serumların hazırlanmasına yönelik araştırma sonuçlarının 1926-1927 yılları arasında *Askerî Tıbb-i Baytarî Mecmûa*'da yayımlandığı, ayrıca 1927 yılında Ellenberger-Schütz'de de bu çalışmalara yer verildiği; Ahmet Bey ve Hüdâi Bey'in, Askerî Veteriner Tatbikat Okulunda ruam üzerine çalışırken hastalığa yakalanarak vefat etmelerinin ardından Osman Nuri Bey ile yaptıkları ortak çalışmaların ayrı bir broşür halinde yayımlandığı bilgisine ulaşılmaktadır. Ancak literatürde bahsi geçen ayrı basım ile ilgili olarak kısa bilgiler dışında, herhangi bir transkripsiyon veya transliterasyon çalışmasına ulaşılamamaktadır.

Bununla birlikte literatürde Osman Nuri Eralp, Ahmet Bey ve Hüdâi Bey'in ruam hastalığına karşı koruyucu ürün geliştirmek üzere yürüttükleri bu çalışmanın ruamla ilgili Türkiye'de bilinen ilk çalışma olduğu vurgulanmaktadır (Dinçer 1969, Uçar 1969, Melikoğlu 2007). Bu minvalde Arap harfleri ile basılı olan ayrı basımın transliterasyonun ilk defa sunulduğu bu araştırmanın bulgular bölümünün hem veteriner hekimliği tarihi hem de Türkiye'de ruam hastalığının patogenezi, klinik seyri ile hastalıkla mücadele tarihi açısından önemli ve değerli olduğu söylenebilir. Yine bu araştırmaları gerçekleştiren Osman Nuri Eralp, Ahmet Bey ve Hüdâi Bey'in Türkiye'de ruam hastalığı ile ilgili çalışmalar açısından orjin teşkil ettiği göz önüne alındığında içeriğin Türkiye'de aşı çalışmaları ve mikrobiyoloji tarihi açısından kaynak niteliğinde olduğu ve daha sonraki araştırmalar ile bağlantısı olabileceği ileri sürülebilir.

Dinçer, ruam hastalığına yakalandıktan kısa süre sonra vefat eden Ahmet Bey ve Hüdâi Bey ile ilgili olarak; genç Cumhuriyetin bilimsel alanda da neleri başarabileceğini göstermek üzere fedakârca yürüttükleri çalışmalarını hem yurt içi hem de yurtdışında yayımlatarak bilimin evrensellik ilkesinin en güzide örneğini sergilediklerinin, bu çalışmaların, öz varlıklarımızın yitilmesini önlemek amacı yanında tüm ulusların ekonomisine ve insan sağlığına yönelmesi bakımından da uluslararası bir nitelik taşıdığına altını çizmektedir (Anonim 1978). Buradan hareketle transliterasyonu yapılan metnin içeriği ile ilgili olarak her ne kadar aşı çalışmaları için olumlu sonuçlara ulaşılmamış olsa da çalışmaların tüm aşamaları ve genel olarak metodolojisinin evrensel bilim ölçütlerine uygun olduğu ve Cumhuriyet dönemi için pozitif bilimin öncü çalışmaları arasında sayılabileceği sonuçlarına varılabilir. Bunun yanı sıra Osman Nuri Eralp, Ahmet Bey ve Hüdâi Bey'in ayrı basımın içeriğinde de yer alan çalışmalarının 1927 yılında Ellenberger-Schütz'de de yayımlanması, yapılan çalışmaların yurt dışında da ilgi görüp takip edildiği ve bilimsel olarak da kabul edildiği şeklinde yorumlanabilir.

Ayrı basımın 17. sayfasından itibaren önce aşılana sonra canlı ruam basili enjekte edilen merkep ve beygir deneyinde, merkebin ruamdan öldüğü ve otopsisinde iç organlarında ciddi hasarlar görüldüğü, beygirin ise canlı ruam basili enjekte edildikten sonra bulaşmayı önlemek amacıyla itlaf edildiği ve otopsisinde doku ve organlarda merkepte olduğu kadar hasara rastlanmadığı bildirilmiştir. Yazarlar tarafından ruama karşı koruyucu bir aşı veya tedavi edici bir yol konusunda başarıya ulaşılamadığı sonucu vurgulanmış olsa da, beygir ve merkep deneyinden elde edilen sonuçlar üzerinden neredeyse ruama karşı etkili bir aşı için önemli bir adım atıldığı yorumu yapılabilir. Hatta metinde de bildirildiği üzere deneyi tekrarlamak ile ilgili sınırlılıklar olmasaydı ruam ile ilgili çalışma ekibinin gayretlerinin farklı bir biçimde sonuçlanmış olabileceği de söylenebilir.

Sonuç olarak; Osman Nuri Eralp, Ahmet Bey ve Hüdâi Bey çalışmalarının derlendiği *Ruam kabîl-i tedavî midir? Ruama karşı aşı ve serum istihzar ve tatbiki mümkün müdür?* başlıklı Arap harfleriyle basılmış olan ve transliterasyonu ilk defa sunulan ayrı basımın, Türkiye'de ruama dair bilimsel çalışmalar açısından ilk olması ve dönemin bilimsel çalışma prensiplerini göstermesi açısından genel de tarih araştırmaları özel de ise veteriner hekimliği tarihi açısından önemli olduğu, çok aşamalı olarak fedakârca yürütülen deneylerde izlenen metodolojinin evrensel ilkelere paralel olduğu, her ne kadar olumsuz sonuçlandığı yazarlar tarafından bildirilmiş olsa da, ruam ile ilgili ileriki tarihlerde gerçekleştirilmiş olan aşı çalışmaları açısından önem arz ettiği ileri sürülebilir.

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

Yazarların Katkı Oranı: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan etmişlerdir.

Etik izin: Bu yazıda sunulan veri, bilgi ve belgeler akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Anonim.** Fenn ve vazife kurbanları Muallim Bakteriyolog Ahmed ve Muavini Hüdâi'ye: Meslektaşlarının bir hatıra-yı hazini. Askerî Tıbb-i Baytarî Mecmûa Külliyyatı No: 6, Hüsn-i *Tabiat* Matbaası, İstanbul, 1928, s. 2.
- Anonim.** Veteriner Bilim Şehitlerimiz Ahmet, Hüdâi ve Kemal Cemil Beyler ölümlerinin 50 nci yılında anıldı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 1978; 25 (2): 339-341.
- Başagaç RT.** Türkiye'de iki dünya savaşı arasında veteriner hekimliği hizmetleri ve hayvancılık politikaları üzerinde araştırmalar. Yayımlanmamış Doktora Tezi, Ankara Üniv Sağlık Bil Enst, Ankara, 2001.
- Derbyshire BJ.** The eradication of glanders in Canada. The Canadian Veterinary Journal. 2002; 43 (9): 722-726.
- Dinçer F.** Türk Askeri Veteriner Hekimleri Dergisi yayın hayatı ve 1923-1969 yılları indeksi. Türk Veteriner Hekimleri Periyodikleri Bibliyografyası -II-, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1971, s. 12.
- Dinçer F.** Türk Askeri Veteriner Hekimliği Öğretimi, Teşkilatı ve Askeri Veteriner Akademisi Tarihçesi. Yayımlanmamış Doçentlik Tezi. Veteriner Fakültesi Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı Arşivi, Ankara, 1969.
- Doğanay M, Yılmaz E, Topluoğlu S, Şahin M, Diker KS, Akçay E, Aktaş D, Yılmaz K, Kılıç S, Köşker Hİ, Yumrutaş M, Kara F, Alp-Meşe E.** Ruam Değerlendirme Raporu. Turk Hij Den Biyol Derg. 2020; 77(EK - 1): 1-24.
- Erk N.** Veteriner Hekimlik (19'uncu Yüzyıl Ortalarında). Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları: 281. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1972, s. 21-23.
- Melikoğlu B.** Osman Nuri Eralp'in "Bakteriyoloji Dersleri" adlı kitabının veteriner hekimliği tarihi açısından değerlendirilmesi. Yayımlanmamış Doktora Tezi, Ankara Üniv Sağlık Bil Enst, Ankara, 2007.
- Osmanoğlu Ş, Melikoğlu B.** Türkiye'de Ruam hastalığı eradikasyon çalışmalarına tarihsel bir bakış açısı. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2009; 15: 331-337.

- Öztürk R, Başağaç RT.** Veteriner Hekimliği tarihinde iz bırakanlar Hüdai-Ahmet-Kemal Cemil. Türk Veteriner Hekimler Dergisi. 2002; 2 (3-4): 54-56.
- Türkay N.** Ruam Hastalığı ve Savaş Yolları. Sümer Matbaası, 1948, s. 29-30.
- Uçar N.** Bilim uğruna hayatını verenler ve ruam. Türk Veteriner Hekimleri Birliği Merkez Konseyi Yayınları. 1969; 15: 19.
- Uçar N.** Memleketimizde insanlarda tespit edilen ruam vak'aları. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. 1960; 1 (1): 65-68.
- Unat EK.** Osmanlı İmparatorluğunda Bakterioloji ve Viroloji. İstanbul Üniv Cerrahpaşa Tıp Fak Yayınları, 4/1568. Çeltüt Matbaacılık, 1970, 17.
- Yabuuchi E, Kasoka Y, Oyazü H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M.** Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov. Microbiology and Immunology, 1992; 36 (12): 1251-1275.
- Yalçın N.** Kemal Cemil'in Pastör Enstitüsündeki hayatı ve çalışmaları. Veteriner Hekimler Dergisi. 1954; 24: 94-95

Serum Levels of Mid-Regional Pro-Adrenomedullin and Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells in Cattle with Pneumonia

Mert SEZER^{1*}, Enes AKYÜZ¹, Oğuz MERHAN², Uğur AYDIN³, Yusuf Umut BATI¹, Uğur YILDIZ³, Tahir GEZER¹, Ekin Emre ERKILIÇ¹, Ali Haydar KIRMIZIGÜL¹, Gürbüz GÖKÇE¹

¹ Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, 36100, Kars, Türkiye

² Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, 36100, Kars, Türkiye

³ Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, 36100, Kars, Türkiye

ABSTRACT

This study aimed to determine the serum levels of two inflammatory biomarkers, named, mid-regional pro-adrenomedullin (MR-Pro ADM) and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells (sTREM-1), in cattle diagnosed with pneumonia. For this purpose, 40 patient female cattle, which were aged 2-7 years and displayed coughing, dyspnea, nasal discharge, anorexia and abdominal respiration, and 15 healthy female cattle within the same age range, were evaluated. The diseased cattle underwent clinical and radiological examinations and were sampled for blood prior to receiving treatment. The healthy subjects also underwent clinical examination and were sampled for blood once. Blood samples were used for biochemical and hematological measurements. While the diseased group had higher serum levels of MR-Pro ADM (86.38 ± 6.33), compared to the healthy control group (61.81 ± 4.96); the pneumonic cattle had lower levels of sTREM-1 (75.93 ± 1.86), in comparison to the healthy group (96.55 ± 9.13).

In conclusion: MR-Pro ADM and sTREM-1 levels are very important diagnostically in cattle with pneumonia.

Key words: Cattle, MR-Pro ADM, Pneumonia, sTREM-1

Pnömonili Sığırlarda Miyeloid Hücrelerde Eksprese Edilen Mid-regional Pro-Adrenomedullin ve Soluble Tetikleyici Reseptörün Serum Düzeyleri

ÖZ

Bu çalışma, pnömoni tanısı konulan sığırlarda mid-regional pro-adrenomedullin (MR-Pro ADM) ve miyeloid hücrelerde eksprese soluble tetikleyici reseptör olmak üzere iki enflamatuvar biyobelirteç ile bazı biyokimyasal ve hematolojik parametrelerin serum düzeylerinin belirlenmesini amaçladı. Bu amaçla 2-7 yaş arası öksürük, nefes darlığı, burun akıntısı, iştahsızlık ve abdominal solunumu gösteren 40 hasta dişi sığır ve aynı yaş aralığında 15 sağlıklı dişi sığır değerlendirildi. Hasta sığırlar tedavi edilmeden önce klinik ve radyolojik muayenelere tabi tutuldu ve kan örnekleri alındı. Sağlıklı sığırlar ayrıca klinik muayeneye tabi tutuldu ve bir kez kan örnekleri alındı. Kan örnekleri biyokimyasal ve hematolojik ölçümler için kullanıldı. Hasta grupta MR-Pro ADM serum düzeyleri ($86,38 \pm 6,33$) kontrol grubuna ($61,81 \pm 4,96$) göre daha yüksek bulundu. Hasta sığırların sTREM-1 seviyeleri ($75,93 \pm 1,86$) sağlıklı gruba kıyasla ($96,55 \pm 9,13$) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu.

Sonuç olarak: MR-Pro ADM ve sTREM-1 seviyeleri pnömonili sığırlarda diagnostik açıdan oldukça önemlidir.

Anahtar kelimeler: Mr-Pro-Adm, Pnömoni, Sığır, sTREM-1

To cite this article: Sezer M, Akyyüz E, Merhan O, Aydın U, Batı Y, U. Yıldız U, Gezer T, Erkiliç E.E, Kırmızıgül A.H, Gökçe G. Serum Levels of Mid-Regional Pro-adrenomedullin and Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells in Cattle with Pneumonia. Kocatepe Vet J. (2023) 16(1):109-117

Submission: 06.12.2022 Accepted: 14.03.2023 Published Online: 15.03.2023

ORCID ID; MS: 0000-0003-1691-7764, EA: 0000-0002-3288-2058, OM: 0000-0002-3399-0667, UA: 0000-0001-5756-4841, YUB: 0000-0001-7528-4376, UY: 0000-0002-4782-1012, TG: 0000-0001-7838-2553, EEE: 0000-0003-2461-5598, AHK: 0000-0002-9283-1391, GG: 0000-0002-2492-5193

*Corresponding author e-mail: sezermert100@gmail.com

INTRODUCTION

One of the primary causes of economic loss in cattle production systems across the world and in Turkey is respiratory diseases. Pneumonia is one of the most commonly encountered bovine respiratory diseases (Issi et al. 2015, Durgut and Köse 2017). Pneumonia is described as the inflammation of the pulmonary tissue and is frequently associated with pleuritis (Dörtkardeş 2018)

One of the leading causes of the high prevalence of pneumonia in cattle is the anatomical structure and physiological characteristics of the bovine lungs. The multilobular structure of the bovine lungs reduces their cleansing capacity. Given the normal anatomical flow of pharyngeal fluids towards the lungs, cattle have a high risk of developing pulmonary hypertension. The lungs of cattle are small compared to their body size. Therefore, their pulmonary capacity is low. The ventilation capacity of bovine lungs at both hot and cold temperatures is low. Furthermore, compared to other animal species, cattle are characterized by weak phagocytic activity in the pulmonary tissue (Kurtdele and Kalınbacak 2016).

The main causes of bovine pneumonia include stress factors, seasonal change, transport, high stocking density (overcrowded housing), unfavorable weather conditions (extreme hot and cold temperatures, storm, high humidity), dust-laden air, poor ventilation, poor management and malnourishment, and immunosuppression (Henry et al. 2012, Hilton 2014, Anonymous 2014, Derek 2014, Gülersoy and Şen 2017). Furthermore, microorganisms involved in the etiology of pneumonia include viral pathogens such as *bovine viral diarrhoea virus* (BVD), *bovine respiratory syncytial virus* (BRSV), *bovine herpes virus type 1*, *parainfluenza virus type 3* (PI3) and bacteria such as *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma spp.* (Hodgins et al. 2002, Radostits et al. 2008, Woolums et al. 2009, Panciera and Confer 2010), *Histophilus somni* (Booker 2005) *Arcanobacterium pyogenes*, staphylococci, streptococci and Gram-negative bacteria belonging to the family *Enterobacteriaceae* (Griffin et al. 2010).

Clinical symptoms associated with pneumonia include anorexia, fever, dyspnea, tachypnea, nasal discharge of varying types (Lopez et al. 2017), coughing, pathological breathing sounds at auscultation, lacrimal discharge, mental slowness (Gülersoy and Şen 2017, Dörtkardeş 2018), crepitation at the auscultation of cases with severe exudation in the respiratory system, friction sounds at the auscultation of cases with effects on the pleura (Griffin et al. 2010), and cyanosis (Ives and Richeson 2015).

Soluble triggering receptor-1 expressed on myeloid cells has a molecular weight of 30 kDa and is found on the surface of neutrophils, monocytes, macrophages and endothelial cells (Adly et al. 2014). TREM-1 is involved in the activation of toll-like

receptors (TLR-2 and TLR-4) (Jin Jeong et al. 2012) and increases inflammatory signals by means of DAP-12 protein (Zhang et al. 2011). Furthermore, TREM-1 mediates the production of cytokines and chemokines, including interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-8 (IL-8) (Smok et al. 2020). The soluble form of triggering receptor-1 expressed on myeloid cells, abbreviated as sTREM 1 (Su et al. 2011), is used for the assessment of the inflammatory response (Gamez-Diaz et al. 2011) and is found in several body fluids, including the cerebrospinal fluid, bronchoalveolar lavage fluid, urine, pleural fluid, and blood plasma (Smok et al. 2020).

One of the precursors of adrenomedullin (ADM) is pro-ADM (Morgenthaler et al. 2005). Adrenomedullin is classified under the family of the calcitonin gene-related peptides (CGRP) (Geven et al. 2018). In the body, ADM is produced in multiple tissues (Valenzuela-Sanchez et al. 2016, Geven et al. 2018), including the pulmonary tissue (Garazzino et al. 2019). ADM has vasodilator (Akpınar et al. 2014), diuretic and natriuretic (Rey et al. 2013), bronchodilator (Önal et al. 2018), antimicrobial (Garazzino et al. 2019), antifungal and anti-inflammatory (Akpınar et al. 2014) effects. ADM is localized to the surface of the epithelium lining the respiratory tract (Valenzuela-Sanchez et al. 2016). In cases of hypoxia, oxidative stress and inflammation, which are induced by lipopolysaccharides (Garayoa et al. 2000) and cytokines such as TNF- α and IL-1 (Ghobrial et al. 2020), ADM synthesis has been determined to increase (Fahmey et al. 2018). It is not possible to measure blood adrenomedullin levels as this peptide hormone rapidly binds to its carrier receptors, has a short half-life and is rapidly metabolized (Geven et al. 2018). Therefore, measurements are targeted at the mid-regional fragment of ADM, referred to as mid-regional pro-adrenomedullin (MR-proADM) (Sönmez and Tülek 2015, Önal et al. 2018, Garazzino et al. 2019).

This study was aimed at determining alterations in the sTREM-1 and MR-proADM levels of cattle diagnosed with pneumonia, based on clinical and radiographic findings.

MATERIAL AND METHOD

The present study was performed pursuant to the approval of the Local Ethics Board for Animal Experiments of Kafkas University (KAU-HADYK/2022-032). The study material comprised of 40 patient female cattle, which were aged 2-7 years, of different breeds, and referred to the Internal Medicine Clinic of the Animal Health Training, Research and Practice Hospital of Kafkas University Faculty of Veterinary Medicine with complaints of coughing, anorexia and fever. Fifteen healthy female

cattle, within the same age range, were maintained for control purposes. The selected diseased animals did not receive any prior treatment. The diseased animals included in the study were selected according to their clinical examination and manifestation of coughing, anorexia, dyspnea, mucosal cyanosis, abdominal respiration, nasal discharge, and pathological sounds such as moist and dry rales and crepitation-friction at auscultation. The body temperature, respiratory rate and pulse of the diseased animals were recorded, and radiographic examinations of pulmones were performed.

Jugular blood samples were collected prior to treatment (at 0 h) from the diseased cattle and only once from the healthy cattle, using a holder and a sterile needle (Vacuette®, Greiner Bio-One GmbH, Austria). Blood samples were drawn into evacuated gel serum tubes (BD Vacutainer®, BD, UK) and evacuated EDTA-coated tubes (BD Vacutainer®, BD, UK). Blood samples in the vacutainers were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes (Hettich Rotina 380R®, Hettich, Germany) for the extraction of serum. The extracted sera were used for the measurement of biochemical parameters, whilst whole-blood samples were used for the measurement of hematological parameters. The sera used for the measurement of sTREM-1 and Mr-Pro-ADM levels were stored at -20 °C until being used for analyses.

With the aid of a fully automated blood cell counter (VG-MS4e®, Melet Schloesing, France), the whole-blood samples were analyzed for the determination of the white blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC), hematocrit percentage (HCT), hemoglobin concentration (HGB), and thrombocyte count (THR). Furthermore, with the aid of a fully automated biochemistry analyzer (Mindray BS120®, Mindray Medical Technology, Istanbul, Turkey) the extracted sera were analyzed for alanine aminotransferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), glucose, creatinine (CREA), urea (UREA), total protein (TP), albumin (ALB), creatine kinase (CK), and iron (Fe) measurements.

Radiological Evaluation

Radiological evaluations were carried out at the Radiology Unit of the Surgery Department of Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine. Radiographic images were taken using a 35x43 cm cassette, in the right or left laterolateral (L/L) view, at 80-85 kV and 20-25 mAs, using a computerized radiography (CR) system (Fujifilm Türkiye).

ELISA Measurements

In the present study, the serum levels of sTREM-1 and MR-proADM were determined with commercial bovine-specific ELISA kits (Bovine sTREM-1 ELISA kit®, Bovine Mr-Pro-ADM ELISA kit®, BT Lab, China). The ELISA test kits were used according to the manufacturer's instructions, and optical density

was measured at a wavelength of 450 nm with an ELISA reader (Thermo Scientific®, USA). The sTREM-1 and MR-proADM values were determined by regression analyses.

Statistical Analysis

Statistical analysis of the data was performed using SPSS® (Version 26.0, Chicago, IL, USA) software. The statistical differences between the groups with normal distribution according to Shapiro-Wilk test were compared by independent sample t-test. The obtained results were given as mean ± standard error of the mean (SEM). $P < 0.05$ was considered significant in the evaluation of the results.

RESULTS

The clinical examination of the diseased cattles included in the study revealed signs of coughing, fever, anorexia, dyspnea, abdominal respiration, nasal discharge of varying types, pathological sounds at pulmonary auscultation, and in cases characterized by severe dyspnea, cyanosis. The vital signs (body temperature, respiratory rate per minute, pulse rate) of the diseased and healthy animals were subjected to comparative statistical evaluation (Table 1). Accordingly, the results demonstrated that values pertaining to the vital signs were significantly higher in the diseased animals, compared to the healthy control subjects ($P < 0.05$).

The WBC, RBC, HCT, HGB and THR values of the diseased and healthy animals are presented in Table 1. The indicated hematological parameters were found to be higher in the diseased animals, in comparison to the healthy control group ($P < 0.05$).

Radiography revealed increased opacity caused by pulmonary consolidation, particularly in the cranial lobes, but distributed throughout the lungs, due to severe pneumonia (Figure 1). The severity of bronchial consolidation decreased caudally, such that severe opacity was replaced by air-filled radiolucent areas, yet all cases displayed severe pneumonia.

The serum biochemical parameters (ALT, AST, glucose, CREA, UREA, TP, ALB, CK, Fe) are presented in Table 2. When compared to the control group, the patient animals had significantly higher ALT, AST and CK activities and CREA, UREA and TP concentrations ($P < 0.05$). Also patient animals had significantly lower ALB, glucose and Fe concentrations ($P < 0.05$).

The serum sTREM-1 and MR-proADM levels of the diseased and healthy animals are given in Table 3. When compared to the healthy controls, the diseased group presented with significantly higher MR-proADM concentrations ($P < 0.05$) and significantly lower sTREM-1 concentrations ($P < 0.05$).

Table 1. Mean values and standard error values (SEM) of physical examination findings and hematological parameters in the patient and control groups.

Parameters	Patient* (n=40)	Control (n=15)	p
	Mean ± SEM		
Rectal temperature (°C)	39.47±0.11	38.42±0.11	<0.001
Breaths/min	44.05±1.69	22.53±1.82	<0.001
Heart beats/min	87.70±1.94	66.00±2.13	<0.001
Total leukocytes count (×10 ³ /μL)	22.29±1.46	9.64±0.99	<0.001
Red blood cell count (x10 ⁶ /μL)	12.61±0.59	9.12±0.63	0.002
Hematocrit (%)	48.73±1.65	36.02±2.29	<0.001
Hemoglobin (g/dL)	18.30±0.75	11.05±0.69	<0.001
Platelet count (x10 ³ /μL)	642.35±38.23	204.53±41.82	<0.001

p<0.05: Indicates statistical significance between pneumonia and control groups.
SEM: Standard error of mean.

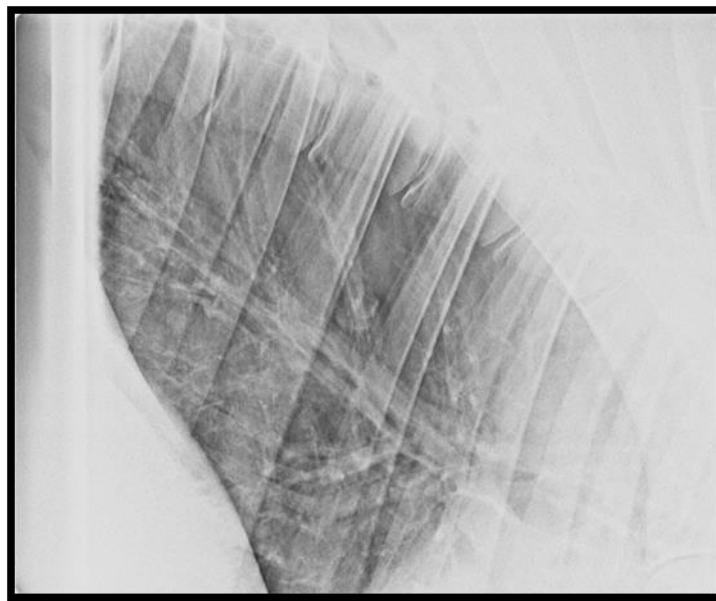


Figure 1: Radiographic image of the lung of one of the cattle in the patient group diagnosed with pneumonia. Radiography revealed increased opacity caused by pulmonary consolidation, particularly in the cranial lobes, but distributed throughout the lungs, due to severe pneumonia. The severity of bronchial consolidation decreased caudally, such that severe opacity was replaced by air-filled radiolucent areas.

Table 2. Mean values and standard error values (SEM) of biochemical parameters in the patient and control groups.

Biochemical Parameters	Patient* (n=40)	Control (n=15)	p
	Mean ± SEM		
Alanine aminotransferase (IU/L)	225.31±22.39	23.20±2.43	<0.001
Aspartate aminotransferase (IU/L)	378.30±28.28	104.73±4.70	<0.001
Creatine (mg/dL)	2.73±0.19	1.20±0.09	<0.001
Urea (mg/dL)	108.53±7.98	31.93±1.68	<0.001
Total protein (g/dL)	8.23±0.40	6.79±0.17	0.002
Albumin (g/dL)	2.78±0.17	3.62±0.15	0.044
Creatine kinase (IU/L)	252.15±17.14	95.13±6.37	<0.001
Glucose (mg/dL)	69.65±5.64	108.73±6.32	<0.001
Iron (mg/dL)	60.27±5.61	105.53±8.00	<0.001

p<0.05: Indicates statistical significance between pneumonia and control groups.
SEM: Standard error of mean.

Table 3. Mean values and standard error values of biomarkers in the patient and control groups.

Biomarkers	Patient (n=40)	Control (n=15)	p
	Mean ± SEM		
MR-Pro-ADM (ng/L)	86.38±6.33	61.81±4.96	0.004
sTREM-1 (ng/L)	75.93±1.86	96.55±9.13	0.043

p<0.05: Indicates statistical significance between pneumonia and control groups.
SEM: Standard error of mean.

DISCUSSION

Bovine pneumonia is associated with multiple clinical signs, including anorexia, fever, and in advanced cases: dyspnea, tachypnea, nasal discharge of varying types (Lopez et al. 2017), coughing, pathological breathing sounds at auscultation, lacrimal discharge, mental slowness (Gülersoy and Şen 2017, Dörtkardeş 2018), keeping the mouth open, rapid opening and closing of the nostrils, stretching forth of the head, keeping the anterior feet apart from the body, difficulty in laying down and standing up, tachycardia, groaning (Guterbock 2014), crepitation at auscultation in cases associated with severe exudation in the respiratory tract, cyanotic appearance of the mucosae and conjunctivae (Ives and Richeson 2015), sound of friction in cases with impact on the pleura (Griffin et al. 2010), decreased production yields and emaciation (Radostits et al. 2007). In agreement with previous reports, in the present study, the diseased animals were observed to display anorexia, fever, coughing, emaciation, dyspnea, tachypnea, tachycardia, nasolacrimal discharge, pathological breathing sounds at auscultation, and cyanosis.

Bacterial and viral bronchopneumonia cases are associated with leukocytosis or leukopenia. Moreover, due to anorexia and hypoxia, these cases also manifest with polycythemia (Gülersoy and Şen 2017). In the present study, the hematological examination of the diseased animals revealed leukocytosis caused

by severe infection, as well as polycythemia caused by anorexia and hypoxia (P<0.05).

In animals, thrombocytosis has been reported to be caused by stress, inflammatory diseases, iron deficiency, drug and corticosteroid use, and polycythemia (Kayar 2013). In the present study, similarly, we considered thrombocytosis to have developed due to the same reasons.

The levels of the hepatic enzymes alanine transferase (ALT) and aspartate transferase (AST) increase in parallel with liver damage, endotoxemia-induced passive congestion, soft tissue damage and tightness of the forestomach (Başer and Civelek 2013, Zeybek 2013). In the present study, the animals diagnosed with pneumonia were also determined to have ALT and AST activities higher than those of the control subjects (P<0.05). We think that the increased activity of these enzymes may be due to soft tissue damage and passive congestion caused by pneumonia-induced endotoxemia.

Renal functions are assessed in view of both serum urea and creatinine levels. Fever caused by severe infection, as well as anorexia, are associated with a dehydration-triggered increase in protein catabolism. In such cases, both blood pressure and the glomerular filtration rate decrease. Eventually, functional kidney disorders occur. Functional disorders of the kidneys are associated with increased serum urea and creatinine levels (Uzlu et al. 2010,

Başer and Civelek 2013, Bal 2019, Eroğlu and Kırbaş 2020). Similar to literature reports, in the present study, when compared to the healthy controls, the diseased cattle were found to present with increased serum urea and creatinine levels ($P<0.05$). We think that urea and creatinine may have increased due to fever, loss of appetite, protein catabolism and dehydration in cattle diagnosed with pneumonia in our study.

In cases of severe infection, soft tissue damage and myopathy occur (Langhans et al. 2014, Rocheteau et al. 2015). This, in return, causes an increase in serum CK activity (Aydın et al. 2018, Akyüz and Gökçe 2021). In agreement with literature data, in the present study, the diseased animals displayed an increased CK activity in comparison to the healthy controls ($P<0.05$).

In the event of dehydration, due to decreased plasma volume, both the total protein level and hemoconcentration increase (Babaç 2014, Eroğlu and Kırbaş 2020). Another cause of an increased total protein level is increased globulin, sialoprotein and fibrinogen levels caused by tissue damage resulting from severe inflammation (Uzlu et al. 2010). The serum levels of albumin, a negative acute-phase protein, decrease under severe inflammatory conditions (Silverstein and Otto 2012). In the present study, in agreement with literature data, the diseased animals were determined to have increased total protein levels and decreased albumin levels, in comparison to the healthy controls ($P<0.05$).

It has been reported that endotoxemia is associated with hypoglycemia (Coşkun and Şen 2012). The underlying reasons of hypoglycemia could be the disruption of the hepatic glucose metabolism (Şen et al. 2009) or infection-induced anorexia (Aydoğdu et al. 2019). In the present study, the blood glucose levels of the diseased group were observed to have significantly decreased ($P<0.05$). This decrease was attributed to both endotoxemia and anorexia.

Iron (Fe) has several significant functions in the body. Found in the structure of hemoglobin, one of its major functions is maintaining the continuation of oxidation. Iron levels decrease in cases of nutrition disorders, acute and chronic infections and severe inflammatory disorders (Kaneko et al. 2008). The decrease observed in serum Fe levels with the development of disease, result from iron being consumed by pathogens, as well the iron stock of tissue fluids being used by the body defense system to prevent the growth of pathogens (Kuru et al. 2015, Yılmaz and Gökçe 2017, Akyüz et al. 2022). Similarly, in our study, we determined that serum Fe concentrations had decreased in the diseased cattle ($P<0.05$). This was attributed to both the severity of pneumonia and malnutrition resulting from anorexia.

The soluble triggering receptor expressed on myeloid cells is found in the cerebrospinal fluid, urine, bronchoalveolar lavage fluid, pleural fluid, and plasma (Smok et al. 2020), and is used to assess the intensity

of inflammation (Su et al. 2016). Reports indicate that this receptor decreases in the event of severe inflammation and acts as a negative acute phase reactivator. The decrease observed in the level of sTREM results from the physical disrupt of the mucosal barrier by inflammatory mediators, leading to the breakdown of this receptor at tissue level. When inflammation develops in the body, neutrophil leukocytes migrate to the damaged tissues, and mucosal damage occurs. The adhesion of the neutrophils, which migrate to tissues, results in a decrease in the sTREM-1 level (Kutlu et al. 2021, Sezer and Gökçe 2021). In agreement with literature reports, in the present study, the animals diagnosed with pneumonia were determined to have decreased sTREM-1 levels.

Adrenomedullin is used for the assessment of the severity of inflammation in cases of sepsis (Abd Elmoutaleb et al. 2016, Geven et al. 2018, Sezer and Gökçe 2021), and diseases of the circulatory and respiratory systems. In such cases, ADM levels increase (Morgenthaler et al. 2005, Bernal-Morell et al. 2018) to regulate vascular tonus and maintain perfusion in the visceral organs (Akpınar et al. 2014, Fahmey et al. 2018). In our study, the diseased cattle were also determined to have increased MR-proADM levels. This increase was attributed to circulatory disorder and tissue perfusion deficiency having developed in the pneumonic cattle.

Previous research suggests that ADM levels increase in parallel with the severity of infections (Simon et al. 2016, Geven et al. 2018). In severe inflammatory diseases affecting the lungs, ADM levels increase because of adrenomedullin not being able to be eliminated from the pulmonary circulation (Abd Elmoutaleb et al. 2016). Cases characterized by reduced glomerular filtration and renal failure have also been reported to be associated with increased ADM levels (Jordan et al. 2014). Furthermore, the glucocorticoid hormone, lipopolysaccharides found in the cell wall of Gram-negative bacteria (Garayoa et al. 2000), cytokines (Ghobrial et al. 2020), anoxia, and inflammation-induced oxidative stress also cause increased ADM levels (Fahmey et al. 2018, Garazzino et al. 2019). ADM is known to have antibacterial and anti-inflammatory effects (Akpınar et al. 2014). In agreement with literature data, in our study, we attributed the increased ADM levels of the diseased cattle to the pulmonary damage, anoxia, oxidative stress and anorexia-induced prerenal failure associated with pneumonia, as well as to the antibacterial and anti-inflammatory effects of adrenomedullin.

CONCLUSION

In conclusion, MR-proADM levels increased and sTREM-1 levels decreased in cattle with pneumonia in this study. We think that MR-proADM and sTREM-1 levels may have diagnostic significance in terms of contributing to clinical findings, radiographic

imaging and laboratory analysis in cattle with pneumonia.

Authors Contribution Rate: The authors declared that they contributed equally to the article.

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

Ethics Committee Information: This study was approved by Kafkas University, Ethics Committee (KAU-HADYEK-2022-032).

REFERENCES

- Abd Elmoutaleb AT, Aly HA, Bayomy EM, Abdelhamed MR, Esmael NF.** Plasma procalcitonin and proadrenomedullin concentrations as predictive markers for early onset neonatal sepsis. *Am J Biochem Biotechnol.* 2016; 6(1): 6-15.
- Adly AAM, Ismail EA, Andrawes NG, El-Saadany MA.** Circulating soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) as diagnostic and prognostic marker in neonatal sepsis. *Cytokine.* 2014; 65: 184-191.
- Akpınar S, Rollas K, Alagöz A, Seğmen F, Sipit T.** Performance evaluation of MR-proadrenomedullin and other scoring systems in severe sepsis with pneumonia. *J Thorac Dis.* 2014; 6(7): 921-929.
- Akyüz E, Gökce G.** Neopterin, procalcitonin, clinical biochemistry, and hematology in calves with neonatal sepsis. *Trop Anim Health Prod.* 2021; 53: 354.
- Akyüz E, Merhan O, Aydın U, Sezer M, Kuru M, Karakurt E, Yıldız U, Bozukluhan K, Batı YU, Yıldız A, Gökce G.** Neopterin, procalcitonin, total sialic acid, paraoxonase-1 and selected haematological indices in calves with aspiration pneumonia. *Acta Vet Brno.* 2022; 91: 115-124.
- Altuğ, N, Özdemir R, Cantekin Z.** Ruminantlarda koruyucu hekimlik: I. Aşı uygulamaları. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 2013; 10(1): 33-44.
- Anonymous.** Antibacterial resistance in foodproducing animals and the food chain. In: *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance.* Geneva, Switzerland: World Health Organization. 2014; p.59-62.
- Aydın F, Umut Ş, Gökçe G, Genç O, Güler MA.** Kars yöresindeki ishalleri buzağılardan bakteriyel ve paraziter etkenlerin izolasyonu ve identifikasyonu. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 20017; (1): 7-14.
- Aydoğdu U, Yıldız R, Güzelbekteş H, Coşkun A, İsmail Ş.** Yenidoğan ishalleri buzağılarda mortalite indikatörü olarak kan laktat, glikoz, total protein ve gama glutamil transferaz seviyeleri. *F Ü Sağ Bil Vet Derg.* 2019; 33(3): 201-206.
- Babaç D.** *Cryptosporidium parvum* ile deneysel enfekte buzağılarda serum demir, bakır ve çinko konsantrasyonlarının incelenmesi. Yüksek Lisans Tez, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 2014.
- Bal D.** Manisa yöresinde neonatal buzağı ishalleri üzerine etiyojik araştırmalar. Yüksek Lisans Tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, 2019.
- Başer DF, Civelek T.** Akut ishalleri neonatal buzağılarda venöz asit-baz durumu ve renal fonksiyon arası korelasyon. *Kocatepe Vet J.* 2013; 6(1): 25-31.
- Batmaz H.** Sığırların İç Hastalıkları, Semptomdan Tanıya, Tanıdan Sağaltıma. Genişletilmiş 2. Baskı, F Özsan Mat San ve Tic Ltd Şti, Bursa, 2010.
- Bernal-Morell E, García-Villalba E, del Carmen Vera M, Medina B, Martínez M, Callejo V, Valero S, Cinesi C, Piñera P, Alcaraz A, Marin I, Muñoz A, Cano A.** Usefulness of midregional pro-adrenomedullin as a marker of organ damage and predictor of mortality in patients with sepsis. *J Infect.* 2018; 76(3): 249-257.
- Booker CM.** The Merck Veterinary Manual, In: Histophilosis, Ed; Merck and Co, 50th Ed., Company. Whitehouse Station (NJ). 2005; p. 606-607.
- Coşkun A, Şen İ.** Haematological, biochemical and coagulation changes in calves with endotoxemia. *Agric J.* 2012; 7: 37-41.
- Derek M.** Review of BRD pathogenesis: the old and the new. *Anim Health Res Rev.* 2014; 15(2):166-8.
- Dörtkardeş AB.** Klinik olarak pnömöni tespit edilen buzağılarda haptoglobulin, serum amiloid A ve hepsidin değerlerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Burdur, 2018.
- Durgut R, Köse Sİ.** Sığırlarda Akut İnterstitiyel Pnömoni Türkiye Klinikleri. *J Vet Sci Intern Med-Special Topics.* 2017; 3(2): 143-7.
- Elitok B, Elitok OM.** Clinical efficacy of carprofen as an adjunct to the antibacterial treatment of bovine respiratory disease. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004; 27(5):317-20.
- Eroğlu MS, Kırbas A.** Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ve sepsis. *F Ü Sağ Bil Vet Derg.* 2020; 34(1): 61-67.
- Fahmey SS, Mostafa H, Abd Elhafeez N, Hussain H.** Diagnostic and prognostic value of proadrenomedullin in neonatal sepsis. *Korean J Pediatr.* 2018; 61(5):156-159.
- Gamez-Diaz LY, Enriquez LE, Matute JD, Velásquez S, Iván DG, Toro F, Ospina S, Bedoya V, Arango CM, Valencia ML, De La Rosa G, Gómez CI, García A, Patiño PJ, Jaimes FA.** Diagnostic accuracy of HMGB-1, s-TREM-1, and CD64 as markers of sepsis in patients recently admitted to the emergency department. *Acad Emerg Med.* 2011; 18: 807-815.

- Garayoa M, Martinez A, Lee S, Pio R, An WG, Neckers L, Trepel J, Montuenga LM, Ryan H, Johnson R, Gassmann M, Cuttitta F.** Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: A possible promotion mechanism of carcinogenesis. *Mol Endocrinol.* 2000; 14(6): 848-862.
- Garazzino S, Altieri E, Denina M.** The role of Pro-adrenomedullin as a marker of severe bacterial infection in children: A Review. *Reports.* 2019; 2:17.
- Geven C, Kox M, Pickkers P.** Adrenomedullin and Adrenomedullin- targeted therapy as treatment strategies relevant for sepsis. *Front Immunol.* 2018; 9:292.
- Ghobrial EE, Khorshied MM, Adly SB, Aziz MM.** Proadrenomedullin as a prognostic biomarker for critically-ill septic children. *Res Square.* 2020; 1:15.
- Griffin D, Chengappa MM, Kuszak J, McVey DS.** Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2010; 26(2): 381-94.
- Guterbock WM.** The impact of BRD: the current dairy experience. *Anim Health Res Rev.* 2014; 15(2):130-4.
- Gülersoy E, Şen İ.** Türkiye Klinikleri J Vet Sci Intern Med-Special Topics. 2017; 3(2): 114-21.
- Henry B, Charmley E, Eckard R, Gaughan JB, Hegarty R.** Livestock production in a changing climate: adaptation and mitigation research in Australia. *Crop Pasture Sci.* 2012; 63: 191-202.
- Hilton WM.** BRD in 2014: where have we been, where are we now, and where do we want to go? *Anim Health Res Rev.* 2014; 15(2): 120-2.
- Hodgins DC, Conlon JA, Shewen PE.** Respiratory viruses and bacteria in cattle, Ed; Brogden KA, Guthmiller JM, Polymicrobial Diseases. Washington DC, ASM Press. 2002; p. 213-230.
- Ives SE, Richeson JT.** Use of antimicrobial metaphylaxis for the control of bovine respiratory disease in high-risk cattle. *Vet Clin Food Anim.* 2015; 31: 341-50.
- Issi M, Eröksüz Y, Öngör H, Gül Y, Kaya M, Çevik A.** Enzootik pnömoni semptomları görülen bir besi sığırı işletmesinde mycoplasma bovis enfeksiyonu. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg.* 2015; 10(1): 39-45.
- Jin Jeong S, Goo Song Y, Oh KC, Won KH, Su KN, Han SH, Choi JY, Kim JM.** Measurement of plasma strep-1 in patients with severe sepsis receiving early goal-directed therapy and evaluation of its usefulness. *Shock.* 2012; 37(6): 574-578.
- Jordan I, Corniero P, Balaguer M, Ortiz J, Vila D, Velasco J, Cambra FJ, Esteban E.** Adrenomedullin is a useful biomarker for the prognosis of critically ill septic children. *Biomark Med.* 2014; 8(9): 1065-1072.
- Kaneko J, Harvey J, Bruss M.** Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Academic Press: University of California, Davis, USA, 2008; p. 936.
- Kayar A.** Kan Hastalıkları. İç Hastalıklar I Ders Notu. İstanbul, 2013.
- Kurtdede A, Kalınbacak A.** Geviş Getiren Hayvanların İç Hastalıkları, In: Solunum Sistemi Hastalıkları, Ed; Gül Y, 4 th Ed., Medipres Yayınevi, Malatya. 2016; p. 231-306.
- Kuru M, Merhan O, Kaya S, Oral H, Kükürt A.** The effect of short term progesterone releasing intravaginal device treatment on acute inflammation markers for Holstein heifers. *Rev Med Vet.* 2015; 166: 336-340.
- Kutlu Y, Toprak İD, Gokden Y, Eruzun H, Arman Y, Yoldemir ŞA, Toprak Z, Tukek T.** The relationship between sTREM-1 and activation of inflammatory bowel diseases. *J Ist Faculty Med.* 2021; 84: 318-323.
- Langhans C, Weber-Carstens S, Schmidt F, Hamati J, Kny M, Zhu X, Wollersheim T, Koch S, Krebs M, Schulz H, Lodka D, Saar K, Labeit S, Spies C, Hubner N, Spranger J, Spuler S, Boschmann M, Dittmar G, Butler-Browne G, Mouly V, Fielitz J.** Inflammation-induced acute phase response in skeletal muscle and critical illness myopathy. *PLoS One.* 2014; 9:e92048.
- Lopez A, Martinson AS.** Respiratory System, In: Pathologic Basis of Veterinary Disease, Ed; Zachary JF, 6th Ed., Elsevier, ST Louis. 2017.
- Mamak N, Kale M, Yapıcı O.** Sığır yetiştiriciliğinde kullanılan aşilar ve önemi. *Göller Bölgesi Aylık Hakemli Ekonomi ve Kültür Dergisi.* 2018; 5(63).
- Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A.** Measurement of Midregional Proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. *Clin Chem.* 2005; 51(10): 1823-1829.
- Önal U, Valenzuela-Sánchez F, Vandana KE, Rello J.** Mid-Regional Pro-Adrenomedullin (MR-proADM) as a biomarker for sepsis and septic shock: Narrative review. *Healthcare.* 2018; 6(3): 110.
- Panciera RJ, Confer AW.** Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. *Vet Clin North Am Food Anim.* 2010; 26: 191-214.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD.** Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses.. 10th Ed., London, England: WB Saunders Company; 2007; p. 508-15.
- Radostits OM., Gay CC., Hinchcliff KW., Constable PD.** Veterinary medicine. 10th Ed., Saunders Elsevier, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, 2008.
- Rey C, García-Hernández I, Concha A, Martínez-Cambor P, Botrán, M, Medina A, Prieto B, López-Herce J.** Pro-adrenomedullin, pro-endothelin-1, procalcitonin, C-reactive protein and mortality risk in critically ill children: A prospective study. *Critical Care.* 2013; 17: R240.

- Rocheteau P, Chatre L, Briand D, Mebarkil M, Jouvion G, Bardon J, Crochemore C, Serrani P, Lecci PP, Latil M, Matot B, Carlier PG, Latronico N, Huchet C, Lafoux A, Ricchetti STM, Chre'tien F.** Sepsis induces long-term metabolic and mitochondrial muscle stem cell dysfunction amenable by mesenchymal stem cell therapy. *Nat Commun.* 2015; 6: 10145.
- Sezer M, Gökçe G.** Sepsis şüpheli buzağlarda Strem-1, Mr-Pro-Adrenomedullin (Mr-Pro-Adm), klinik biyokimya ve hematoloji üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars, 2021.
- Silverstein D, Otto CM.** Sepsis, In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Ed; Greene CE, 4th Ed., St.Louis, 2012; p. 359-369.
- Simon TP, Martin L, Doemming S, Humbs A, Bruells C, Kopp R, Hartmann O, Struck J, Bergmann A, Marx G, Schuerholz T.** Plasma adrenomedullin in critically ill patients with sepsis after major surgery: A pilot study. *J Crit Care.* 2016; 38: 68-72.
- Smok B, Domagalski K, Pawłowska M.** Diagnostic and prognostic value of IL-6 and sTREM-1 in SIRS and sepsis in children. *Mediators Inflamm.* 2020; 2020: 8201585.
- Sönmezer MÇ, Tülek N.** Bakteriyel infeksiyonlarda ve sepsiste biyobelirteçler. *Klinik Derg.* 2015; 28(3): 96-102.
- Su L, Feng L, Zhang J, Xiao Y, Jia Y, Yan P, Feng D, Xie L.** Diagnostic value of urine sTREM-1 for sepsis and relevant acute kidney injuries: A prospective study. *Crit Care.* 2011; 15: 2-10.
- Su L, Liu D, Chai W, Liu D, Long Y.** Role of sTREM-1 in predicting mortality of infection: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2016; 6(5): e010314.
- Şen I, Altunok V, Ok M, Coskun A, Constable PD.** Efficacy of oral rehydration therapy solutions containing sodium bicarbonate or sodium acetate for 109 treatment of calves with naturally acquired diarrhea, moderate dehydration, and strong ion acidosis. *J Am Vet Med Assoc.* 2009; 234(7): 926-934.
- Turgut K.** Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis Kitabı, In: *Disproteinemiler ve Testleri, Gluteraldehit Testi*, Ed; Turgut K, 2th Ed., Konya, 2000; pp. 487-509.
- Tuzcu N, Tuzcu M, Akçakavak G.** Sığırlarda farklı pnömoni tiplerinde tümör nekroz faktör alfa (TNF α), malondialdehit (MDA), prokalsitonin ve neopterin düzeylerinin karşılaştırılması. *Etilik Vet Mikrobiyol Derg.* 2020; 31 (1): 52-61.
- Uzlu E, Karapehlivan M, Çitil M, Gökçe E, Erdoğan HM.** İshal semptomu belirlenen buzağlarda serum sialik asit ile bazı biyokimyasal parametrelerin araştırılması. *Van Vet J.* 2010; 21(2): 83-86.
- Valenzulea-Sanchez F, Valenzuela-Mendez B, Rodriguez-Gutierrez JF, Estella-Garcia A, Gonzalez-Garcia MA.** New role of biomarkers: Mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. *Ann Transl Med.* 2016; 4(17): 329.
- Woolums AR., Ames TR., Baker JC.** Lower Respiratory Tract Diseases, In: *Large Animal Internal Medicine*, Ed; Smith BP, 4th Ed., Mosby Elsevier, St Louis, Missouri. 2009; 601-642.
- Yılmaz O, Gökçe G.** Investigations on clinic, haematology, biochemistry, oxidative stress, acute phase proteins in infectious respiratory disease complex (BRDC) in cattle. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg.* 2017; 12: 34-44.
- Zeybek S.** Akut ishaller neonatal buzağlarda intravenöz izotonik sodyum bikarbonat uygulamasının venöz asit-baz durumu ve renal fonksiyon üzerine zamana bağlı etkileri. Yüksek Lisans Tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, 2013.
- Zhang J, She D, Feng D, Jia Y, Xie L.** Dynamic changes of serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) reflect sepsis severity and can predict prognosis: a prospective study. *BMC Infect Dis.* 2011; 11: 53.

A Case of Thoracic Spondylosis Deformance in a Boxer Dog

Zülfükar Kadir SARITAŞ^{1*}, Zehra YAŞAR¹, Fatma GÖRÜCÜ¹, Yusuf KOÇ¹, Musa KORKMAZ¹, Musa YILMAZ¹

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

ABSTRACT

The material of this case report was consisted of a 5-years-old boxer male dog. In the anamnesis information obtained, it was learned that the patient was reluctant and felt pain while walking and going up and down the stairs, had incoordination disorder in the front extremities, and walked wobbly. In the clinical and orthopedic examination, no fracture or dislocation findings were found in the extremities. It was observed that he gave pain responses during the examination. In the thoracic LL, VD and abdominal LL radiographs of the patient, bone growths were detected between the vertebrae. Bone growths in the form of bridging were observed between the thoracic and lumbar T3-T4, T4-T5, T5-T6 and L2-L3, L4-L5, L6-L7 vertebrae. In the treatment, Prednol was administered at a dose of 2 mg/kg, IV on the first day and IM on the next two days. Every other day, B-complex vitamin support was provided and physical therapy was recommended. As a result, it is thought that sharing a rare case of cranial thoracic spondylosis deformans with our clinical colleagues will contribute to clinical practice.

Key words: Boxer, cranial thoracic spondylosis deformans, dog, X-R images.

Bir Boxer Irkı Köpekte Torakal Spondilozis Deformans Olgusu

ÖZ

Bu olgu sunumunun materyalini 5 yaşlı, boxer ırkı erkek köpek oluşturdu. Alınan anamnez bilgide olgunun yürürken ve merdiven inip çıkarken isteksiz olduğu ve ağrı duyduğu, ön ekstremitelerde koordinasyon bozukluğu olduğu, sallantılı şekilde yürüdüğü öğrenildi. Yapılan klinik ve ortopedik muayenede ekstremitelerde kırık ve çıkık bulgusuna rastlanılmadı. Muayene sırasında ağrı tepkileri verdiği izlendi. Olgunun alınan torakal LL, VD ve abdomen LL radyografilerinde vertebralar arasında kemik üremeleri olduğu tespit edildi. Torakal ve lumbal T3-T4, T4-T5, T5-T6 ve L2-L3, L4-L5, L6-L7 omurlar arasında köprüleşme şeklinde kemik üremeleri gözlemlendi. Tedavide Prednol 2 mg/kg dozunda ilk gün IV sonraki iki gün IM yapıldı. Gün aşırı B-kompleks vitamin desteği sağlandı ve fizik tedavi önerildi. Sonuç olarak nadir olarak rastlanan kranial torakal spondilozis deformans olgusunun klinik hekimliği yapan meslektaşlarımızla paylaşmanın klinik pratiğe katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Boxer, köpek, kranial torakal spondilozis deformans, radyolojik muayene

To cite this article: Saritaş Z.K, Yaşar Z, Görücü F, Koç Y, Korkmaz M, Yılmaz M. A Case of Thoracic Spondylosis Deformance in a Boxer Dog. Kocatepe Vet J. (2023) 16(1):118-121

Submission: 28.09.2022 Accepted: 28.02.2023 Published Online: 08.03.2023

ORCID ID; ZKS: 0000-0002-7659-6635, ZY: 0000-0002-9030-5478, FG: 0000-0001-7630-0788, YK: 0000-0002-6342-5466, MK: 0000-0002-7646-0009, MY: 0000-0001-6557-9613

*Corresponding author e-mail: zksaritas@hotmail.com

GİRİŞ

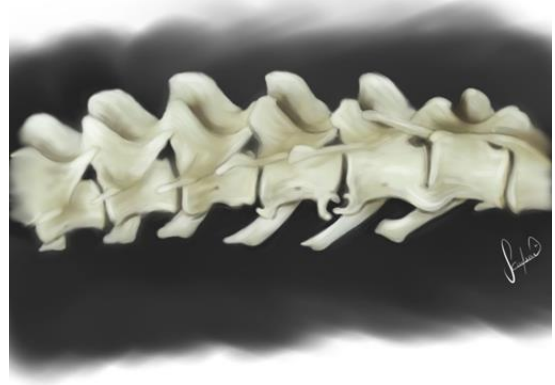
Spondilozis deformans; korpus vertebra'ların ventral ve lateral yüzeylerinde lokalize olan ve zamanla ardışık iki vertebra arasında kemik köprüleşmesi ile sonuçlanabilen, yangısal olmayan omurga rahatsızlığıdır (Devecioğlu ve Yücel 2002).

Spondilozis deformans genellikle klinik olarak önemi göz ardı edilse de, lateralize yeni kemiğin foramen intervertebralea'ya girmesi sinir kökü sıkışmasına ve ardından klinik belirtilere neden olabilir. Yeni kemik, ilerlemenin aşamasına bağlı olarak tam veya eksik köprüleşme oluşturabilir. Genellikle sınırları belli kortikal ve medüller bileşenlerden oluşur. Lezyonun etkilediği intervertebral diskler daralabilir ve disk materyali mineralize olabilir (Wisner ve Zwingenberger 2015). Spondilozis deformans'ta osteofitler ile birlikte dejeneratif değişiklikler de görülebilir, ancak osteofit oluşumu, diğer dejeneratif değişiklikler oluşmadan önce şekillenir (Şekil 1). Spondilozis deformans'ta osteofitler ve dejeneratif değişiklikler yangısal etkenlerden bağımsızdır. Etiyolojisinde yangının olmamasından dolayı spondilitis değil, spondilozis terimi kullanılır (Kaya 2016).

Veteriner hekimlikte radyografik inceleme, osteofit oluşumunun belirlenmesinde en sık başvurulan yöntemdir. Radyolojik görüntülerde uç plaklarda genellikle ventral veya lateral yeni kemik oluşumunun köprülenmesinden oluşur. Kemik parçaları omurdan ayrılabilir. Spondilozis deformansın temel önemi, onu diğer patoloji biçimlerinden ayırt etmektir. Özellikle, bir lateral radyografideki lateral spondiloz, diskal mineralizasyonu veya diğer kemik proliferasyon biçimlerini taklit edebilir (Holloway ve Schwarz 2016). Köpeklerde spondiloz deformans insidansı cinsiyet, yaş ve cins ile ilişkilendirilmiştir. Durum, yaşlılıkta daha yüksek insidans ile her yaşta tanımlanmıştır (Morgan 1967). Alman çoban köpekleri ve Boxer ırkı köpekler bu hastalığa karşı predispozisyon gösteren köpek ırklarıdır. Kedilerde ise bu hastalık en fazla torakal bölgede (T4-T10) gözlenirken, omurların T10-S1 segmentinde hastalığın şiddet derecesi daha yüksektir (Kaya 2016). Spondilozis deformans'ın öncelikli lokalize olduğu bölgeler, kaudal torakal ve kaudal lumbal vertebra ile lumbo-sakral aralık olarak belirtilmiştir. Bu hastalıkta; lezyonun çoğunlukla radyolojik incelemeler sırasında tesadüfen ortaya çıktığı ve çok ender ciddi nörolojik bozukluklara neden olduğu bilinmektedir (Devecioğlu ve Yücel 2002).

Spondilozis'in özel bir tedavi şekli yoktur. Böyle hastalara tam istirahat, vücut ağırlığının azaltılması için diyet uygulamasının yapılması, egzersiz sınırlandırılması ve fizyoterapi gibi konservatif yöntemlere ek olarak damar içi yolla procaine enjeksiyonları, nonsteroid antiinflamatuvar ilaç

(NSAİİ) uygulamaları ile günümüzde semptomatik tedaviye başvurulmaktadır (Kaya 2016).



Şekil.1. Spondilozis deformansta osteofit gelişim derecesini gösteren çizim.

Figure 1. Drawing showing the degree of osteophyte development in spondylosis deformans.

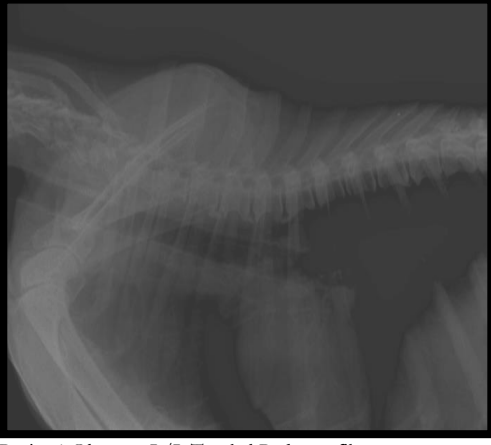
- I. derecesinde osteofit, küçük kemik çıkıntısı şeklinde olup vertebral kenarların kranial veya kaudal köşelerini aşmamıştır.
- II. derecesinde osteofitler birbirlerine doğru yönelerek vertebral kenarların kranial veya kaudal köşelerini ventral düzeyden aşmış halde izlenir.
- III. derecesinde ise iki vertebral kenarın kranial ve kaudal köşelerindeki osteofitler ventralden veya laterallerden birleşmiş, köprüleşmiş şekilde izlenir (Kaya 2016).

OLGUNUN TANIMI

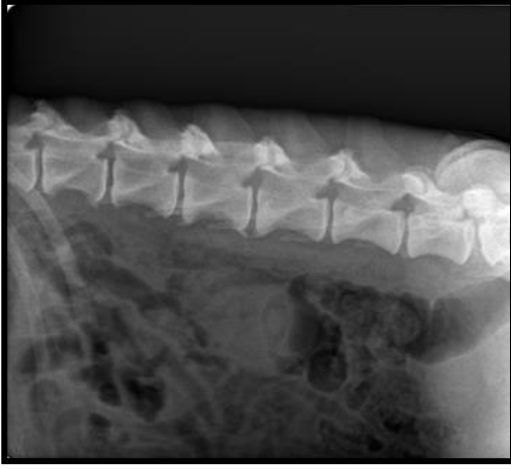
Bu olgu sunumunun materyalini; Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Cerrahi Kliniğine ajite bir halde yürümede isteksizlik, 2-3 gündür devam eden iştahsızlık şikâyetleri ile getirilen 5 yaşında Boxer ırkı erkek köpek oluşturdu. Alınan anamnez bilgide köpeğin yürürken, merdiven inip çıkarken isteksiz olduğu ve ağrı duyduğu, ön ekstremitelerde koordinasyon bozukluğu olduğu, sallantılı şekilde yürüdüğü öğrenildi. Yapılan klinik muayene sonrası ekstremitelerin palpasyon muayenesinde kırık ve çıkık bulgusuna rastlanılmadı. Muayene sırasında ağrı tepkileri verdiği izlendi. Radyolojik muayenede; Torakal LL (Resim 1), VD (Resim 2) ve abdomen LL (Resim 3) radyografik görüntülerde torakal bölgede T3-T4, T4-T5, T5-T6 omurlar ile lumbal bölgede L2-L3, L4-L5, L6-L7 omurlar arasında köprüleşme şeklinde kemik üremeleri olduğu gözlemlendi.

Tedavide hastaya Prednol 2 mg/kg dozunda ilk gün IV iki gün IM uygulandı. Gün aşırı B-kompleks (Norogrizovim) vitamin desteği sağlandı. Fizik tedavi önerildi.

TARTIŞMA VE SONUÇ



Resim 1. Olgunun L/L Torakal Radyografik görünümü
Picture 1. X-ray image of L/L thoracic aspect of the case.



Resim 2. Olgunun L/L Abdominal Radyografik görünümü.
Picture 2. Abdomen L/L Radiography of the case.



Resim 3. Olguya ait Abdomen V/D Radyografik görünümü.
Picture 3. Abdomen V/D Radiographic image of the case.

Kaya'nın da (2016) belirttiği gibi Alman çoban köpekleri ve Boxer ırkı köpekler bu hastalığa karşı predispozisyon gösteren köpek ırklarıdır. Bu olguya konu olan hastanın 5 yaşlı Boxer ırkı erkek köpek olması literatür bilgisi destekler niteliktedir.

Devecioğlu ve Yücel (2002) spondilozis deformans'ın öncelikli lokalize olduğu bölgeleri, kaudal torakal ve kaudal lumbal vertebralar ile lumbo-sakral aralık olarak belirtmiştir. Çalışmaya konu olan olguda literatür bilginin dışında üremelerin kranial torakal bölgelerde yerleşim göstermiş olması nadir görülen bir durumdur. Sunulan bu olguda kemik üremeleri özellikle T3-T4, T4-T5, T5-T6 arasında gözlenmiştir ve bu durum ön ekstremitelerdeki koordinasyon bozukluğunu açıklar niteliktedir.

Spondilozis'in kesin bir tedavisi yoktur. Bu tür rahatsızlığı olan hastalara bölgesel infraruj uygulamaları, fizik tedavi, parenteral analjezikler ve kortikosteroid uygulamaları önerilebilir. Bu uygulamalar, hastanın yaşamını daha az ağrı ile idame ettirmesini sağlayabilir. Kaya (2016), böyle hastalara kesin istirahat, fizyoterapi gibi konservatif yöntemlere ek olarak damar içi yolla Procaine enjeksiyonları, nonsteroid antiinflatuvar ilaç (NSAİİ) uygulamaları ile semptomatik tedaviyi önermektedir. Literatür bilgilerle örtüşür şekilde kliniğimize gelen bu hastaya Sefazolin Sodyum (Equizolin –IM/IV 1000 mg, Tüm Ekip İlaç), 22 mg/kg dozunda IV sabah akşam 5 gün olacak şekilde kullanılmaya başlandı. Prednol 2 mg/kg dozunda ilk gün IV iki gün IM yapıldı. Gün aşırı B-kompleks (Norogrizovim IM, Deva Holding) vitamin desteği sağlandı.

Bu olgu sunumunda nadir rastlanan kranial torakal spondilozis deformans olgusunu klinik hekimliği yapan meslektaşlara aktarmak ve literatüre katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Etik Kurul Bilgileri: Bu çalışma “Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esasları Hakkında Yönetmelik” 8(k) gereğince HADYEK'in iznine tabi değildir. Bu makalede sunulan veri, bilgi ve belgeler akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde edilmiştir.”

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Yazar Katkı Oranları: Bu makalenin yazımında tüm yazarların eşit oranda katkısı vardır.

KAYNAKLAR

- Antepliođlu H.** Köpeklerde rastladığımız spondylitis vakalarının klinik, radyolojik görünümleri ile tedavi sonuçları. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 16(03), 1969.
- Devecioğlu Y, Yücel R.** Köpeklerde kolumna vertebralis ve medulla spinalis lezyonlarının klinik değerlendirilmesi, İstanbul Onİv, Vet. Fak. Derg. 28 (2). 361 -379, 2002.
- Holloway A, Schwarz T.** Chapter 9, Radiology of the vertebral column, BSAVA Manual of Canın and Feline Radiography and Radiology, Holloway A, McConnell F, Quedgeley, England, 2016,pp. 381.
- Kaya M.** Spondilozis deformans ve dissemine iskelet hiperostozu. Türkiye Klinikleri J Vet Sci Surg-Special Topics 2016;2(3):113-9
- Morgan J. P.** Spondylosis deformans in the dog: a morphologic study with some clinical and experimental observations. Acta Orthopaedica Scandinavica.1967, 38(sup96), 1-88.
- Wisner R.E, Zwingenberger A.L.** Section 3,İntervertebral disk disease and other degenerative disorders, Atlas of Small Animal CT and MRI, John Wiley & Sons, Inc, 1th Ed. Iowa, USA, 2015, pp.357-358.

A Case of Myiasis in a Biting Wound in a Red Fox (*Vulpes vulpes*)

Zülfükar Kadir SARITAŞ¹, Emine Hesna KANDIR², Fatma GÖRÜCÜ¹, Yusuf KOÇ^{1*}, Beste SARAÇOĞLU²

¹ Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, 03200, Afyonkarabısar, Türkiye

² Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Wild Animal Diseases and Ecology, 03200, Afyonkarabısar, Türkiye

ABSTRACT

In this case report, a female adult red fox (*Vulpes vulpes*) found exhausted by the villagers in rural area of Eskişehir constituted the study material. A rare myiasis disease was diagnosed in the Red Fox (*Vulpes vulpes*) who was examined in the Surgery Clinic of the Veterinary Health Application and Research Center. Myiasis is a clinically important condition that can lead to a wide variety of diseases caused by fly larvae. In the case under consideration, multiple puncture wounds containing skin and subcutaneous connective tissues were detected in the thoracic region. The exhausted fox was restrained without the need for any anesthetic procedure, and the wound area was shaved, wound debridement was performed with polyvinyl iodine and the larvae were removed manually with forceps. The treatment was terminated with a favorable prognosis, as the red fox was compliant with the treatment during the examination and recovery period and no extra systemic and wound complications were encountered. In conclusion, myiasis, which is rarely formed in the injuries of red foxes encountered in the wild, and the formation of a rapid recovery process with a routine treatment were discussed in order to inform our colleagues and readers and increase their experience.

Keywords: Myiasis, Red fox, *Vulpes vulpes*, Wound treatment

Bir Kızıl Tilki'de (*Vulpes vulpes*) Isırılma Yarasında Miyazis Olgusu

ÖZ

Bu olgu sunumunda, Eskişehir'in kırsal bölgesinde köylüler tarafından bitkin halde bulunan dişi ergin bir kızıl tilki (*Vulpes vulpes*) çalışma materyalini oluşturdu. Veteriner Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Cerrahi kliniğinde muayene edilen Kızıl Tilki'de (*Vulpes vulpes*) nadir görülen miyazis hastalığı teşhis edildi. Miyazis klinik açıdan önemi olan ve sinek larvalarından kaynaklanan çok çeşitli hastalığa kapı açabilen bir durumdur. Ele alınan olguda torakal bölgede deri ve derialtı bağ dokuları içeren çok sayıda puntur yarası belirlendi. Bitkin düşen tilkinin herhangi bir anestezi işlemi gerek kalmadan zaptı raptı sağlanarak yara bölgesi traşlandı, polivinil iode ile yara debridmanı gerçekleştirildi ve larvalar manuel olarak pens ile uzaklaştırıldı. Kızıl tilkinin muayene ve iyileşme süresinde tedaviye uyumlu davranması ve ekstra sistemik ve yara yeri komplikasyonuna rastlanmaması ile prognoz olumlu şekilde tedavi sonlandırıldı. Sonuç olarak, yaban hayatta karşılaşılan kızıl tilkilerin yaralanmalarında nadiren şekillenen miyazis durumu ve rutin bir tedavi ile hızlı bir iyileşme sürecinin şekillenmesi meslektaşlarımızın ve okuyucuların bilgilendirilmesi ve tecrübelerinin artırılması amacıyla ele alındı.

Anahtar Kelimeler: Kızıl tilki, Miyazis, *Vulpes vulpes*, Yara tedavisi

To cite this article: Saritaş Z.K, Kandır E.H, Görücü F, Koç Y, Saraçoğlu B. A Case of Myiasis in a Biting Wound in a Red Fox (*Vulpes vulpes*). Kocatepe Vet J. (2023) 16(1):122-126

Submission: 19.11.2023 Accepted: 18.02.2023 Published Online: 15.03.2023

ORCID ID; ZKS: 0000-0002-7659-6635, EHK: 0000-0002-2712-6792, FG: 0000-0001-7630-0788, YK: 0000-0002-6342-5466, BS: 0000-0002-1006-2841

*Corresponding author e-mail: ykoc03@hotmail.com

INTRODUCTION

Well adapted to nature, red foxes occupy a wide variety of rural and urban habitats. Mostly nocturnal, these foxes lie down during the day. They give birth in dens in the spring. The family group consists of a dominant couple, their offspring, and usually young individuals born in the previous year. Red foxes are omnivores; Their natural diet consists mainly of small mammals, although they also eat birds, invertebrates, carrion, and fallen fruit. The male (canine) fox weighs about 5.5 to 9 kg, while the female (vixen) weighs about 3.5 to 7.5 kg. Trauma from motor vehicle accidents, bite wounds, or fighting are relatively common causes of trauma in red foxes. Bite wounds from pet dogs are a common cause of pup death in urban areas. Various other ectoparasites have been reported in foxes, including fleas and ticks; they are usually of little clinical significance and treatment is rarely required. Myiasis can be seen in weak animals (usually young offspring). Removal of fly eggs and maggots should be accompanied by aggressive treatment of the underlying disease, but the general condition of these animals deteriorates due to the underlying disease and the prognosis is often poor (Couper and Bexton 2016).

The term myiasis was first proposed by Hope in 1840 and comes from the Greek word *myia* (μύια), meaning fly. Myiasis is the infestation of the skin by the larvae (worms) of various species of flies (order Diptera; true flies; i.e. adults with two wings) that feed on the host's live, necrotic/dead tissues, bodily fluids, or food ingested by them over a period of time (Choi et al. 2015, de Souza et al. 2010). Schematically, myiasis is categorized as an infestation of natural cavities and openings, such as the skin, ears, and vagina, and mucous membranes. Skin involvement is the most common type of myiasis. Various factors such as traumatic injuries, other dermatological diseases, skin infestations caused by ticks form the basis of skin myiasis. Skin myiasis is classified as fruncular (sometimes called "hypodermic"), migrans (migratory) and wound (traumatic) myiasis. In fruncular and migratory myiasis, the larvae penetrate the subcutaneous tissue. In wound myiasis, fly larvae cause infestation in suppurated wounds, chronic ulcers or necrotic skin (Heukelbach et al. 2005). The diagnosis of myiasis can be made easily and is based on clinical findings and identification of the larvae. The vast majority of myiasis cases are clinically self-limited. However, especially in myiasis where larval development takes a long time, the host can be damaged significantly. Feeding and growth of the larvae can cause severe inflammation and pain. Treatment is planned according to the type of

myiasis. In myiasis affecting the cavities and orifices (especially the mouth, nose, and eyes), all larvae must be surgically removed. Wound myiasis requires complete debridement. Wound myiasis can be treated with occlusion, irrigation, manual removal of larvae and/or larvicides (Ivermectin). In occlusion approaches, by applying petroleum jelly, liquid paraffin, wax, nail polish or high-viscosity oils placed on the central punctum, the larvae are prevented from breathing and move towards the skin surface. Larvae are removed manually with forceps. Antibiotic therapy is usually not necessary when adequate disinfection is achieved (McGraw and Turiansky 2008, Penny 1989, Perez-Banon et al. 2020).

CASE HISTORY

In this case report, a female adult red fox (*Vulpes vulpes*) found exhausted by the villagers in rural area of Eskişehir constituted the study material. The red fox was brought to Afyon Kocatepe University Wildlife Rescue Rehabilitation Training Application and Research Center (AKÜREM) in October 2019 by the officials of the 5th Regional Directorate of Nature Conservation and National Parks Eskişehir Branch upon the notice of the villagers. A rare diagnosis of wound myiasis was made in *Vulpes vulpes*, which was referred to the Veterinary Health Application and Research Center Surgery Clinic from AKÜREM for consultation. In the aforementioned case, multiple puncture wounds of various sizes containing skin and subcutaneous connective tissues were detected in the dorsal region of the thoracic region. Two-way radiographs of the area were taken in the case with paraparesis in the hind extremities and the wound area reminding of a gunshot wound. While no pellets or fracture were detected in the radiograph, myiasis was observed in the wound area. In the exhausted fox, the wound area was shaved by providing restraint without the need for any anesthetic procedure, wound debridement was performed with ether iodoforme and polyvinyl iode, respectively, and the larvae were removed manually with forceps (Figure 1,2). Wound prophylaxis was provided with topical antibiotic spray (Neo-caf, MSD, Italy) application for two weeks instead of systemic antibiotic treatment. In addition, the general situation was supported by supplementing with vitamins. The treatment was terminated with a favorable prognosis, as the red fox was compliant with the treatment during the examination and recovery period, did not have any extra systemic disease and no wound complications were encountered. After a month of care and treatment, rabies vaccine was applied and released to nature (Figure 3,4).



Figure 1: The restraint of the red fox, the shaving of the wound



Figure 2: A- Fly larvae (star), B- Larvae removed.



Figure 3: Red fox before its release into the wild



Figure 4: Closed state of the wounds

DISCUSSION

Trauma from motor vehicle accidents, bite wounds, or fighting are relatively common causes of trauma in red foxes. Myiasis has been reported in weak animals (usually young offspring) (Couper and Bexton 2016). In this case report, it was determined that the wounds were caused by bite and wound myiasis was formed. It has been suggested that the removal of fly eggs and maggots in baby foxes should be accompanied by aggressive treatment of the underlying disease, and the prognosis was stated to be unfavorable (Couper and Bexton 2016). Since the fox discussed in this case report is an adult and has no other underlying etiology, it responded to topical treatment and recovered completely. This is consistent with the knowledge that the majority of myiasis cases are clinically self-limited (Heukelbach et al. 2005).

CONCLUSION

In conclusion, myiasis, which is rarely formed in the injuries of red foxes encountered in the wild, and the formation of a rapid recovery process with a routine treatment were discussed in order to inform our colleagues and readers and increase their experience.

Conflict of Interest: The authors declared that there is no conflict of interest.

Ethical Approval: This study is not subject to the permission of HADYEK in accordance with the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees" 8 (k). The data, information and documents presented in this article were obtained within the framework of academic and ethical rules.

Note: Presented as a summary at the 17th National and 3rd International Veterinary Surgery Congress(2022).

REFERENCES

- Choi J, Kim H, Na J, Kim SH, Park C. Cutaneous myiasis associated with tick infestations in a dog. *J Vet Clin.* 2015; 32(5):473-475.
- Couper D, Bexton S. Veterinary treatment of fox casualties. In *Pract.* 2016; 38(3):130-138.
- de Souza CP, Verocai GG, Ramadinha RH. Myiasis caused by the New World screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) in cats from Brazil: report of five cases. *J Feline Med Surg.* 2010; 12(2):166-168.
- Heukelbach J, Walton SF, Feldmeier H. Ectoparasitic infestations. *Curr Infect Dis Rep.* 2005; 7(5):373-380.
- McGraw TA, Turiansky GW. Cutaneous myiasis. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2008; 58(6):907-926.
- Penny DS. Fly strike in a dog. *Vet Rec.* 1989; 125(1):24-24.
- Pérez-Bañón C, Rojas C, Vargas M, Mengual X, Rojo S. A world review of reported myiasis caused by flower flies

(Diptera: Syrphidae), including the first case of human myiasis from *Palpada scutellaris* (Fabricius, 1805). *Parasitol Res.* 2020; 119(3):815-840.

Instruction for Authors

Kocatepe Veterinary Journal (KVJ) has the policy with One Medicine One Health. Research article, reviews, brief communication and case reports, letters to editor and book reviews are also welcome for consideration to publish articles of high scientific and ethical standards.

The journal is published four times a year. The publication of the text and figures is **free** of charge.

Acceptance of papers for the KVJ is undertaken by Editors. Editorial Board members adjudicate in the case of conflicting or adverse reports.

Manuscripts are accepted for consideration on the understanding that they are for publication solely in KVJ and that they neither have been published nor are under consideration for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher.

Each author accepts all ethical responsibility of the article and all authors agree with the content of the study. After article is checked by Professional Plagiarism Prevention program, article will be sent to authors. Articles are checked by iThenticate® program, when plagiarism or self-plagiarism are detected, they will not be evaluated for publication.

If animals are used in the studies, study should be approved by an Ethical Committee, Name of Ethical Committee and Approved Number should be mentioned in the Material and Method section. Editor may be reject directly the article, if animal is exposed to stressful or painful conditions.

Authors accept ethical rules when article is sent for publication. Author(s) should send Copyright Transfer Agreement, after acceptance of article.

Each author accepts all ethical responsibility of the article and all authors agree with the content of the study.

Article should be written using Garamond, font of 11 point, with 1.5 line spacing, margins of the A4 paper should be 2.5 cm from all edges (Word97-2010.doc). Abbreviations should be written in SI. Research article submitted to Kocatepe Veterinary Journal should be divided into the following sections:

Title page (Abstract, Key words without authors name and address), **Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, Tables, Graphics, Figures.**

Title page: Papers should be headed with the full title, the initial letters of name and surnames of the authors, the name and address of the institution where the work is carried out. The telephone number, fax number and e-mail address of the corresponding author should also be provided. The title should be short, specific and informative.

Abstract Should be no more than 200 words, outlining in a single paragraph.

Keywords, 5 keywords that describe the crucial points of the paper should be provided. Keywords should be chosen from Turkey Science Term (www.bilimterimleri.com)

Introduction, an updated literature related to paper and aim(s) of the study should be clearly given in this section.

Materials and methods, a clear account of materials used and methods employed should be given and it should be applicable/repeatable by other researchers.

Results, as concise as possible. Text, tables and figures illustrating the same data should be limited and succinctly outline the pertinent outcomes of the study.

Discussion: Results of the study should be discussed with directly relevant references. This section may also be divided into subsections.

Conclusions: This section should state clearly the main conclusions of the research. Results should not be repeated.

Acknowledgements, it is advised to acknowledge persons or institutions directly or indirectly involved in the study.

References

References in the text should be made as follows: **Kara (2012)** described. / . was reported (**Zemheri 2015, Eryavuz and Yeni, Eryavuz et al. 2015**). List of references should be given alphabetically in the reference list. Different publications having the same author(s) of same year should be written as **2011a, 2011b**. Web address should be referenced as **anonim** for example **Anonim 2015**. Only official web pages should be used. Author name(s) and date should be written bold. The reference list at the end of the paper should be written as below.

Journal:

Ince S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fidan AF, Eryavuz A. The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2010; 24(3):161-164.

Book section:

Juneja R, Koide SS. *Molecular Biology of Reproduction*, In: *Reproduction in Farm Animals*, Ed; HafezB, Hafez ESE, 7th Ed., LippincottWilliams and Wilkins, Philadelphia, USA. 2000; pp. 354-361.

Web page:

Anonymous. http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&cust_id=13;Accessien date: 02.01.2012.

Thesis:

Yeni D. Some andrological parameters and biochemical properties in relation to season in rams. PhD thesis, Afyon Kocatepe University Health Science Institute, Afyonkarahisar, 2010.

Tables: Tables should be presented in a separate page at the end of manuscript.

Graphics: Figures should be presented in a separate page at the end of manuscript.

Figures : Figures should be presented in a separate page at the end of manuscript. Figures should be 80 or 160 mm, minimum 300 dpi.

Titles of tables, graphics and figures should be both Turkish and English.

Brief Communications: Brief communications should be concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later publication. They should not exceed 1600 words. They should bear no more than two tables or figures. An ABSTRACT should be given but no other sections. Typescripts should be clearly marked Brief Communication.

Review Articles: Review articles related to all medical topics are welcome for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians or clinicians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4500 words. It should have a precise abstract. Author of review should have at least two citations. For each issue maximum 2 reviews are published.

Case Reports: Reports of SINGLE or small numbers of cases will be considered for publication in KVJ if the case(s) are particularly unusual/rare or the report contributes materially to the literature. A case report should not exceed 1500 words and must comprise a Summary (maximum 150 words), Introduction, Case History and Discussion. The report should accomplish one of the followings:

- To be a substantially novel presentation
- To be a technique or treatment that would substantially alter management and prognosis of the described condition
- The first clinical report or first case(s) of diseases in a particular location where epidemiology is an important factor
- To exemplify best practice in medical science.

Letters to The Editor: Letters describing case reports or original material may be published in the KVJ and will be peer-reviewed prior to publication. Letters making criticisms on recently published papers in the KVJ will also be considered and the corresponding authors of the original paper will be invited to respond accordingly.

All articles sent to KVJ (Kocatepe Veterinary Journal) ONLINE submission only.

During submission documents which are listed below, have to install to the system;

1. **Title Page:** Author and institution names
2. **Main text:** Author and institution names should NOT be. Tables(s), graphic(s) and figure(s) etc. Should be on the last page of article, also title of them both in Turkish and English.
3. **Article addition:** Table(s), graphic(s) and figure(s) should have been installed to the system separately.
4. **Author Approval Form (Cover Letter):** All authors need to sign it and install to the system. Signatures should be wet signatures and send to the Editorial Board of Kocatepe Veterinary Journal.
5. **Copyright:** All authors need to sign it and install to the system. Signatures should be wet signatures and send to the Editorial Board of Kocatepe Veterinary Journal.