



Official Publication of  
The Afyon Kocatepe University  
Faculty of Veterinary Medicine

# K o c a t e p e Veterinary Journal

2023, 16(4), December



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

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. Akin YAKAN  
Prof. Dr. Kemal Kaan TEKİNŞEN  
Assoc. Prof. Dr. Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU

#### Foreign Language Editor

Dr. Mustafa ÖZBEK  
Rifat UÇAR

#### Statistics Editors

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

#### Organising Committee

Prof. Dr. Fatih FİDAN  
Prof. Dr. Metin ERDOĞAN  
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  
Prof. Dr. Oktay Yılmaz  
Afyon Kocatepe University-Turkey  
Assoc. Prof. Dr. İbrahim Kılıç  
Afyon Kocatepe University-Turkey  
Assoc. Prof. Dr. M. Fatih Bozkurt  
Afyon Kocatepe University-Turkey  
Assoc. Prof. Dr. Süleyman Aypak  
Adnan Menderes 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://www.kvj.aku.edu.tr)

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

*\*Only accepts online submission\**

**The Reviewer List (in alphabetical order)**

Ahmet Onur Girişgin  
Armağan Erdem Ütük  
Bahar Onaran Acar  
Devran Coşkun  
Ece Koç Yıldırım  
Ediz Kağan Özgen  
Erdal Kara  
Erdiç Türk  
Erhan Keyvan  
Fahriye Zemheri Navruz  
Feride Kırçali Sevimli  
Funda Ekşi  
Göksel Doğan  
Halil Yalçın  
Harun Hızlısoy  
Hasan Aydın  
Hüseyin Özkan  
İlkay Doğan  
Mehmet Yıldız  
Musa Tatar  
Mustafa Açıcı  
Mustafa Uğurlu  
Mustafa Yipel  
Ömer Çakmak  
Ruhi Kabakçı  
Salar Zarrabi Ahrabi  
Seda Dicle Korkmaz  
Semiha Yalçın  
Serdar Koçak  
Sevda Uçar Gelen  
Tuncer Çakmak  
Uğur Aydın  
Uğur Aydoğdu  
Yusuf Biçer  
Yusuf Sinan Sırın  
Zafer Usta  
Zehra Bozkurt  
Zuhal Önder  
Zülfikar Kadir Sarıtas  
Bursa Uludağ University  
Çukurova University  
Ankara University  
Siirt University  
Aydın Adnan Menderes University  
Atatürk University  
Kırıkkale University  
Hatay Mustafa Kemal University  
Burdur Mehmet Akif Ersoy University  
Bartın University  
Afyon Kocatepe University  
Çukurova University  
Aydın Adnan Menderes University  
Burdur Mehmet Akif Ersoy University  
Erciyes University  
Adıyaman University  
Hatay Mustafa Kemal University  
Gaziantep University  
Van Yuzuncu Yıl University  
Kastamonu University  
Ondokuz Mayıs University  
Ondokuz Mayıs University  
Hatay Mustafa Kemal University  
İstanbul Esenyurt University  
Kırıkkale University  
Marmara University  
Giresun University  
Muğla Sıtkı Koçman University  
Afyon Kocatepe University  
Atatürk University  
Van Yüzüncü Yıl University  
Kafkas University  
Balıkesir University  
Selçuk University  
Burdur Mehmet Akif Ersoy University  
Burdur Mehmet Akif Ersoy University  
Afyon Kocatepe University  
Erciyes University  
Afyon Kocatepe University

## RESEARCH ARTICLES

<b>Rapid Confirmation Analysis of Multiple Antibiotic Residues in Honey by LC-MS/MS</b> ( <i>Balda Çoklu Antibiyotik Kalıntılarının LC-MS/MS ile Hızlı Doğrulama Analizi</i> ) Nurullah ÖZDEMİR	464-471
<b>Investigating Parasites of Water Buffaloes (<i>Bubalus bubalis</i>) by Fecal Examination in Samsun</b> ( <i>Samsun Yöresi Mandallarında (Bubalus bubalis) Dışkı Bakışı ile Tespit Edilen Parazitler</i> ) Ali Tümay Gürler, Coşkun Aydın, Cenk Soner Bölükbaş, Şakir Önder Türlek, Mehmet Öztürk, Rahşan Akpınar, Tuğçe Tuygun, Selma Kaya, Elif Burcu Gençay Topçu, Öykü Barılı, Rubeyda Dinç, Mustafa Açıcı, Şinasi Umur	472-480
<b>The Effect of Adding Herbal Extract Blend to the Rations of Quails at Different Stocking Density on Performance, Meat Quality and Some Oxidative Stress Parameters</b> ( <i>Farklı Yerleşim Sıklığında Yetiştirilen Buldrcınların Rasyonlarına Bitkisel Ekstrakt Karışımı Katılmasının Performans, Et Kalitesi ve Bazı Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkisi</i> ) Meltem ÖZTÜRK AYDIN, Özcan CENGİZ	481-490
<b>Evaluating the Awareness Level of Zoonotic Diseases Among Final-Year Veterinary Students</b> ( <i>Veteriner Fakültesi Son Sınıf Öğrencilerinin Zoonoz Hastalıklar Konusundaki Farkındalık Düzeylerinin Değerlendirilmesi</i> ) Berna YANMAZ	49-495
<b>Effects of <i>Artemisia dracunculus</i> L. and <i>Origanum majorana</i> L. Extracts Added in Different Concentrations on Some Possible Foodborne Pathogenic Bacteria in Hamburger Patties</b> ( <i>Değişik Konsantrasyonlarda ilave Edilen Artemisia dracunculus L. ve Origanum majorana L. Ekstraktlarının, Hamburger Köftesinde Bulunması Muhtemel Bazı Gıda Kaynaklı Patojen Bakteriler Üzerine Etkileri</i> ) Gökhan AKARCA, Nursah CERAN	496-503
<b>Effect of Alpha Lipoic Acid on Polychlorinated Biphenyl (Aroclor 1254)-Induced Nephrotoxicity in Rats</b> ( <i>Saçanlarda Poliklorlu Bijenil (Aroclor 1254) ile Oluşturulan Nefrotoksosite Üzerine Alfa Lipoik Asitin Etkisi</i> ) Mustafa YILDIZ	504-512
<b>A Study on Ectoparasites of the Some Wild Mammals (Mammalia) and Reptiles (Reptilia) in Türkiye</b> ( <i>Türkiye'deki Bazı Yabani Memeli (Mammalia) ve Sürüngenlerde (Reptilia) Görülen Ektoparazitler Üzerine Bir Çalışma</i> ) Bilal DİK, Emine Hesna KANDIR	513-520
<b>Goat Sperm Vitrification</b> ( <i>Teke Spermasının Vitrifikasyonu</i> ) Çiğdem ÇEBİ, Ricardo FAUNDEZ	521-529
<b>Comparison of Hen Performance and Mortality of Commercial Layer Flocks by Strain and Cage Type</b> ( <i>Genotip ve Kafes Tipine Göre Ticari Yumurtacı Sürülerde Tavuk Performansı ve Ölüm Oranlarının Karşılaştırılması</i> ) Sema KABA, Zehra BOZKURT	530-540
<b>The Effects of High Calcium and Vitamin D on the Fructose- Induced Lipogenesis Pathway in Rats</b> ( <i>Ratlarda Yüksek Kalsiyum ve Vitamin D'nin Fruktozla İndüklenmiş Lipogenez Yolağı Üzerine Etkileri</i> ) Semiha Özge KARA, Akın YAKAN	541-555
<b>Comparative Analysis of Phenolic Compounds in Honey and <i>Momordica charantia</i> Linn</b> ( <i>Bal ve Momordica charantia Linn'deki Fenolik Bileşiklerin Karşılaştırmalı Analizi</i> ) Nilay KEYVAN	556-562
<b>Evaluation of Poisoning Cases in The Emergency Department</b> ( <i>Acil Servise Gelen Zehirlenme Vakalarının Değerlendirilmesi</i> ) Selen BÜYÜKÇAVUŞOĞLU, Yavuz Osman BİRDANE	563-573
<b>Antibacterial Activity of Neutral Electrolyzed Water Against <i>Listeria monocytogenes</i></b> ( <i>Nötral Elektrolize Suyun Listeria monocytogenes'e Karşı Antibakteriyel Etkinliği</i> ) Gülşay Merve BAYRAKAL, Ali AYDIN, Çağla SARIMADEN NASRİ, Gürhan ÇİFTÇİOĞLU	574-579
<b>Determining The Presence of Equine Herpesvirus-1 and Equine Herpesvirus-4 Infections by Real-Time PCR in Horses in Kars Region</b> ( <i>Kars Bölgesindeki Atlarda Real-Time PCR ile Equine Herpesvirus-1 ve Equine Herpesvirus-4 Enfeksiyonlarının Araştırılması</i> ) Ayhan AKMAN, Rahşan AKPINAR, Semistan KIZILTEPE	580-587
<b>Reproductive Performance, Milk Yield Parameters, and Some Postpartum Diseases That Are Associated with Clinical And Subclinical Ketosis in Dairy Cows</b> ( <i>Sütcü Sığırlarda Klinik ve Subklinik Ketozis ile İlişkili Üreme Performansı, Süt Verim Parametreleri ve Bazı Postpartum Hastalıklar</i> ) Ahmet Özer CAMBAZ, Gökhan BOZKURT	588-596
<b>Effects of Supplementation of Boron and Vitamin C on Lipid and Hematological Parameters in Rats</b> ( <i>Saçanlarda Bor ve Vitamin C Takviyesinin Hematolojik ve Lipid Parametrelerine Etkileri</i> ) Bestami Kemal GÜMÜŞAY, Abdullah ERYAVUZ	597-605
<b>Antibiogram Results of <i>Escherichia coli</i> in Calf Diarrhea and <i>Escherichia coli</i> Bacteria in Aksaray Province in The Last Three Months</b> ( <i>Aksaray İli Buzağı İşhallerinde Escherichia coli ve Escherichia coli Bakterisinin Son Üç Aylık Antibiyogram Sonuçları</i> ) Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU, Melek AYDEMİR, Elif Selin ŞENOĞLU, Zeki ARAS	606-613
<b>CASE REPORT</b>	
<b>A case of surgical treatment of Type 2 Atresia Ani and Rectovaginal Fistula in a Kitten</b> ( <i>Bir Yavru Kedide Tip 2 Atresia Ani ve Rectovajinal Fistülün Cerrahi Tedavisi Olgusu</i> ) Melek Ece ARINIR, Emine Esmâ ÇERKEZ, Zihni MUTLU	614-618



## Rapid Confirmation Analysis of Multiple Antibiotic Residues in Honey by LC-MS/MS

Nurullah ÖZDEMİR\*

<sup>1</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Tekirdağ Namık Kemal University, Tekirdağ, Türkiye

### ABSTRACT

Honey is a natural product containing high levels of sugar, amino acids, minerals, enzymes and vitamins and has been used as food and medicine for thousands of years. In terms of public health, honey should not contain any chemicals that may pose a health risk. Both pesticides used in agricultural areas around the apiary and drugs used in the treatment of bee diseases cause residue problems in honey. In the study, it was aimed to develop a method for rapid confirmation analysis of multiple antibiotic residues in honey samples using a two-stage liquid-liquid extraction method. With the developed method, sulphonamide (n:11), fluoroquinolone (n:2), phenicol (n:2) tetracycline (n:2) and macrolide (n:2) were used in honey samples. Screening and confirmation analyses can be performed for 19 antibiotic residues in 5 different antibiotic groups. The detection limits of the method are between 5.29 and 10.58 µg.kg<sup>-1</sup>, the accuracy values are between 86.9% and 119%, the coefficient of variation is between 1.26% and 16.33% and recovery is between 84% and 117.23%.

**Keywords:** Antibiotic, Confirmation, Honey, LC-MS/MS, Residue

\*\*\*

### Balda Çoklu Antibiyotik Kalıntılarının LC-MS/MS ile Hızlı Doğrulama Analizi

#### ÖZ

Bal, yüksek oranda şeker, aminoasit, mineral madde, enzim ve vitamin içeren, binlerce yıldır gıda ve ilaç olarak kullanılan doğal bir üründür. Halk sağlığı açısından, balda sağlık riski oluşturabilecek herhangi bir kimyasal maddenin bulunmaması gerekir. Gerek arılık çevresindeki tarımsal alanlarda kullanılan pestisitler, gerekse arı hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar, bal da kalıntı sorunlarının yaşanmasına neden olmaktadır. Çalışmada, iki farklı likit-likit ekstraksiyon metodu kullanılarak bal örneklerinde çoklu antibiyotik kalıntılarının hızlı doğrulama analizleri için metot geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen metotla, bal örneklerinde, sulfonamid (n:11), flourokinolon (n:2), fenikol (n:2) tetrasiklin (n:2) ve makrolid (n:2) olmak üzere 5 farklı antibiyotik grubunda 19 adet antibiyotik kalıntısı için tarama ve doğrulama analizleri yapılabilir. Metodun tespit limitleri 5,29 ile 10,58 µg.kg<sup>-1</sup>, doğruluk değerleri %86,9 ile %119 varyasyon katsayı değerleri %1,26 ile %16,33 ve geri kazanım oranları %85,4 ile %117,23 arasındadır.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyotik, Bal, Doğrulama, Kalıntı, LC-MS/MS

To cite this article: Özdemir N. Rapid Confirmation Analysis of Multiple Antibiotic Residues in Honey by LC-MS/MS  
Kocatepe Vet J. (2023):16(4):464-471

Submission: 25.07.2023 Accepted: 29.09.2023 Published Online: 27.10.2023

ORCID ID; NÖ: 0000-0003-4310-2077

\*Corresponding author e-mail: nozdemir@nku.edu.tr

## GİRİŞ

Bal, yüksek oranda şeker, aminoasit, mineral madde, enzim ve vitamin içeren, binlerce yıldır gıda ve ilaç olarak kullanılan doğal bir üründür (Ball, 2007). Halk sağlığı açısından, balda sağlık riski oluşturabilecek herhangi bir kimyasal maddenin bulunmaması gerekir. Gerek arılık çevresindeki tarımsal alanlarda kullanılan pestisitler, gerekse arı hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlar, bal da kalıntı sorunlarının yaşanmasına neden olmaktadır (Lambert ve ark., 2013)

Balarısı kolonileri de diğer canlılarda olduğu gibi bakteri, virüs, protozoa ve paraziter etkenler tarafından etkilenebilmektedirler (Chantawannakul ve ark., 2016). Özellikle bakteriyel kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde kloramfenikol, nitrofuranlar, nitroimidazoller, tetrasiklinler, sulfonamidler, streptomisin, fumagillin ve florokinolon grubu antibiyotikler kullanılabilir. Bu tür ilaçlarla tedavi edilen arı kolonilerinden elde edilen ballarda, kalıntı problemi ile karşılaşabilmektedir (Chiesa ve ark., 2016). Tetrasiklinlerin yarı ömürleri, tetrasiklinin türevine, dozuna veya uygulama şekline bağlı olarak 9 gün ile 8 hafta arasında olduğu saptanmıştır (Reybroeck ve ark., 2012). Stabilitelerinin yüksek olması nedeniyle streptomisin, sulfonamidler ve linkomisin için, 10 ay sonra bile mg/kg seviyelerinde kalıntıları tespit edilmiştir. Benzer bulgular, yüksek konsantrasyonların tespit edildiği fluorokinolon kalıntıları için de gözlenmiştir (Varenina ve ark., 2023).

Bu durum özellikle dış piyasaya ihraç edilen ballarda oldukça önem arz etmektedir. Yapılan analizlerde balda herhangi bir ilaç kalıntısının tespit edilmesi ve bu durumun sürekli olması durumunda, ülkemizin dış ticaretinde itibar kaybı yaşanmasına neden olmaktadır.

AB tarafından yayınlanan 37/2010 yönetmeliğinde antibiyotikler dahil olmak üzere tüm veteriner tıbbi ürünlerin hayvansal gıda maddelerindeki maksimum kalıntı limitleri listelenmiştir. Bu yönetmeliğe göre balda herhangi bir antibiyotik kalıntısı için limit belirlenmemiştir (CR, 2010). Bazı ülkelerde (Japonya, Avustralya ve Kanada) balda oksitetrasiklin için 300 µg.kg<sup>-1</sup> Maksimum Kalıntı Limiti (MRL) belirlenmiştir (Moretti ve ark., 2017). Avrupa Birliği, Ortak Referans Laboratuvarı (CRL) tarafından yayınlanan teknik kılavuzda balda önerilen konsantrasyonlar (RC'ler) tetrasiklinler (20 µg.kg<sup>-1</sup>), sulfonamidler (50 µg.kg<sup>-1</sup>), streptomisin (40 µg.kg<sup>-1</sup>) ve makrolidler (tylosin ve eritromisin, 20 µg.kg<sup>-1</sup>) verilmiştir. Bununla birlikte, bu RC'lerin gerçek bir yasal dayanağı bulunmamaktadır (CRL, 2007)

Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından AB direktiflerine uygun olarak yayınlanan Türk Gıda Kodeksine göre hayvansal gıdalarda bazı maddeler için maksimum

kalıntı limitleri belirlenmiş, bunların dışında herhangi bir ilaç kalıntısı bulunmasına izin verilmemiştir (Resmî Gazete, 2017). Ülkemizde üretilen balların bu yönetmelikte belirlenen limitlere uygun olarak üretilmesi gerekir. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yıllık olarak yayınlanan Kalıntı İzleme Genelgesi kapsamında tüm illerde üretilen ballarda kalıntı analizleri gerçekleştirilmektedir. Kalıntı tespit edilen örneklerin alındığı üreticiler, izlemeye alınmakta, tekrar kalıntı tespit edildiğinde yasal işlemler uygulanmaktadır.

Balda antibiyotik kalıntı analizlerinde likit-likit ekstraksiyon (LLE) (Chen ve ark., 2009), katı faz ekstraksiyon (Solid Phase Extraction, SPE) (Xu ve ark., 2016) ve QuChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) (Yang ve ark., 2022) gibi metotlar kullanılmaktadır. Tarama amaçlı olarak ELİSA (Mahmoudi ve ark., 2014), Charm II (Salter, 2003), Chemiluminescence (Wutz ve ark., 2011) gibi testler kullanılırken, doğrulama amaçlı olarak ultraviyole (UV) (Bargańska ve ark., 2011), floresans (FD) (Peres ve ark., 2010), kütle spektrometri (MS) (Lopez ve ark., 2008) gibi detektörler tercih edilmektedir. Bu cihazlar içerisinde en hassas duyarlılığa sahip olan ve doğrulama analizlerinde tercih edilen cihaz LC-MS/MS cihazıdır.

Çalışmamızın amacı, iki likit-likit ekstraksiyon metodu kullanılarak bal örneklerinde çoklu antibiyotik kalıntılarının hızlı doğrulama analizleri için metot geliştirmektir. Geliştirilen metot, hızlı ve ekonomik, aynı zamanda çoklu antibiyotik kalıntısı doğrulama metodu olarak kullanılabilir.

## MATERYAL ve METOT

### Standart maddeler

Çalışmada kullanılan standart maddeler ve saflık yüzdeleri tablo 1'de gösterilmiştir. Tüm standart maddelerin saflık yüzdeleri %93'ün üzerindedir ve Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

### Çözeltiler

**Mobil faz A:** Diyonize su; %0,01 formik asit (FA), 1 mM okzalik asit (OA), 1 mM amonyum format

**Mobil Faz B: Asetonitril** %0,02 Formik asit Mobil faz gradient akış program tablo 2 'de olduğu gibidir.

**Stok standart çözeltisi (S<sub>0</sub>):** Her bir standart maddeden ayrı ayrı olmak üzere, 10 ml'lik balon jöjelere 10 mg tartıldı ve üzeri 10 ml çizgisine kadar metanolle tamamlandı. Bütün stok standart çözeltiler -18°C'de muhafaza edildi.

**Tablo 1.** Antibiyotik Standartları ve Saflık Yüzdeleri  
**Table 1.** Antibiotic Standards and Purities (%)

No	ANTİBİYOTİK ADI	SAFLIK %	ÜRETİCİ FİRMA
1	Dapson	≥99,5	Sigma-Aldrich
2	Enrofloksasin	≥99,8	Sigma-Aldrich
3	Eritromisin	≥93,0	Sigma-Aldrich
4	Florfenikol	≥99,5	Sigma-Aldrich
5	Kloramfenikol	≥99,9	Sigma-Aldrich
6	Norfloksasin	≥99,8	Sigma-Aldrich
7	Oksitetrasiklin	≥94,9	Sigma-Aldrich
8	Sulfakloropiridazin	≥99,7	Sigma-Aldrich
9	Sulfadiazin	≥99,8	Sigma-Aldrich
10	Sulfadimetoksin	≥99,7	Sigma-Aldrich
11	Sulfadoksin	≥98,0	Sigma-Aldrich
12	Sulfamerazin	≥98,0	Sigma-Aldrich
13	Sulfametazin	≥99,6	Sigma-Aldrich
14	Sulfametoksazol	≥99,9	Sigma-Aldrich
15	Sulfapiridin	≥98,0	Sigma-Aldrich
16	Sulfaküinoksalin	≥97,8	Sigma-Aldrich
17	Sulfatiazol	≥98,0	Sigma-Aldrich
18	Tetrasiklin	≥95,0	Sigma-Aldrich
19	Tilozin	≥95,5	Sigma-Aldrich

#### **S<sub>2</sub> standart çalışma çözeltisi (100 µg/ml):**

Her bir standart stok çözeltiden 0,1 ml 10 ml'lik balona alınarak metanolle 10 ml'ye tamamlandı. Analizlere kadar buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi. Hazırlanan bu çözelti, MS detektörde referans standartları tanımlamak için kullanılmıştır.

#### **Örneklerin Ekstraksiyonu**

##### **Asidik ekstraksiyon**

Bal örneği 40 °C de ısıtılarak hazır hale getirildi. 1 g bal tartılarak 50 ml lik polipropilen tüpe alındı. 3 g NaCl, 3,75 ml McIlvaine Buffer (pH 3) ve 75 ml 0,1 M etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) eklenip karıştırıldı. Karışımın üzerine 10 ml asetonitril eklenip 5 dk vortekslenildi. Ardından 60 °C de 20 dk ultrasonik banyoda tutuldu.

**Tablo 2.** Mobil faz gradient akış programı

**Table 2.** Mobile phase gradient flow program

Akış süresi	Mobil Faz A	Mobil Faz B
0-5	90	10
5-7	85	15
7-11	80	20
11-15	60	40
15-16	40	60
16-20	90	10

4000 rpm de 30 dk santrifüj edildi. Üst fazdan 9 ml alınıp azot altında uçuruldu. 500 µl mobil faz A/B (80-20 v/v) karışımı ile çözdürüldü. 0,2 µm filtrelerden geçirilerek vialde alındı.

##### **Bazik ekstraksiyon**

Bal örneği, 40°C de ısıtılarak hazır hale getirildi. 2 g bal tartılarak 50 ml'lik polipropilen tüpe alındı. 2 g NaCl ve 2 ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=8) ve 3,75 ml 0,1 M EDTA eklendi ve iyice vortekslenildi. Karışımın üzerine 10 ml asetonitril eklenip tekrar vorteksle karıştırıldı. Daha sonra 60°C de 20 dk ultrasonik banyoda tutuldu. 4000 rpm de 30 dk santrifüj edildi. Üst fazdan 9 ml alınarak azot altında uçuruldu. 500 µl mobil faz A/B (80-20 v/v) karışımı ile çözdürüldü. 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek vialde alındı.

##### **MS/MS Şartları**

Kütle spektrofotometri dedektörü olarak AB Sciex 3200 QTRAP (AB Sciex, Foster City, USA) kullanıldı. UHPLC, kütle spektrofotometri dedektörüne bağlı olarak çalışmaktadır. Analitik ayırım için Agilent Poroshell 120 SB, C18, 2,7 µm, 100x3,0 mm. kolonu kullanıldı. Akış hızı 0,3 ml/dk olarak ayarlandı.

İyonizasyon, pozitif ve negatif iyon modunda ve elektrosprey iyonizasyon (ESI) modülü kullanılarak gerçekleştirildi. Tarama tipi, MRM (Multiple Reaction Monitoring) olarak ayarlandı. Kapillar voltaj 4500 V, azot gazının kullanıldığı curtain gas (30 psi), collision gas (medium) ve İon Source gas (50 psi) olarak ayarlandı. TurboIonSprey modülünün sıcaklığı 500 °C'de sabitlendi. Analite bağımlı parametreler; DP (declustering potansiyeli), CE (çarpışma enerjisi) ve CXP (hücre çıkış potansiyeli) için her bir standart maddenin 0,1 mg/kg içeren çalışma standart çözeltisi kullanıldı. Her bir analite ait MS/MS dedektör parametreleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

## **BULGULAR**

Metot validasyonu için seçicilik/hassasiyet, doğrusalılık, tespit limiti (Limit of Detection, LOD), ölçüm limiti (Limit of Quantitation, LOQ), doğruluk ve geri kazanım parametreleri hesaplandı.

**Tablo 3.** MS/MS dedektör parametreleri  
**Table 3.** MS/MS detector parameters

Analitler	Q1 (Da)	Q3 (Da)	DP (volts)	EP (volts)	CEP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Dapson	294,10	156,00*	81,000	5,000	14,000	17,000	4,000
		108,00	81,000	5,000	14,000	29,000	4,000
Enrofloksasin	360,12	316,30*	61,000	10,000	26,000	21,000	6,000
		245,20	61,000	10,000	26,000	29,000	4,000
Eritromisin	734,38	158,30	56,00	5,50	28,000	35,000	4,000
		83,10	56,00	5,50	28,000	69,000	4,000
Florfenikol	248,05	230,10*	31,000	7,500	14,000	15,000	4,000
		130,10	31,000	7,500	14,000	33,000	4,000
Kloramfenikol	320,88	257,20*	45,000	4,500	22,000	10,000	2,000
		237,10	45,000	4,500	22,000	26,000	8,000
Norfloksasin	320,14	302,20*	56,000	7,500	24,000	27,000	6,000
		230,90	56,000	7,500	24,000	51,000	4,000
Oksitetrasiklin	461,04	426,10*	46,000	6,000	22,000	21,000	6,000
		201,20	46,000	6,000	22,000	49,000	4,000
Sulfakloropiridazin	285,10	156,20*	71,000	8,000	16,000	17,000	4,000
		108,10	71,000	8,000	16,000	33,000	4,000
Sulfadiazin	251,06	156,10*	51,000	7,000	14,000	19,000	4,000
		108,10	51,000	7,000	14,000	31,000	4,000
Sulfadimetoksin	311,07	156,20*	61,000	8,500	16,000	23,000	4,000
		108,20	61,000	8,500	16,000	35,000	4,000
Sulfadoksin	311,06	156,10*	51,000	5,500	18,000	23,000	4,000
		108,20	51,000	5,500	18,000	33,000	4,000
Sulfamerazin	265,07	108,00*	46,000	8,500	14,000	33,000	4,000
		156,00	46,000	8,500	14,000	21,000	4,000
Sulfametazin	279,07	124,10*	41,000	5,000	18,000	33,000	4,000
		186,20	41,000	5,000	18,000	19,000	6,000
Sulfametoksazol	254,09	156,10*	46,000	5,500	14,000	19,000	4,000
		108,10	46,000	5,500	14,000	33,000	4,000
Sulfapiridin	250,13	156,10*	51,000	5,000	14,000	21,000	4,000
		108,10	51,000	5,000	14,000	33,000	4,000
Sulfaküinoksalin	301,03	156,10*	51,000	4,500	16,000	21,000	4,000
		92,10	51,000	4,500	16,000	39,000	4,000
Sulfatiazol	255,98	156,10*	46,000	6,500	14,000	17,000	4,000
		108,20	46,000	6,500	14,000	31,000	4,000
Tetrasiklin	445,10	410,00*	71,000	10,000	20,000	21,000	6,000
		154,10	71,000	10,000	20,000	33,000	4,000
Tilozin	916,34	174,20*	91,000	10,000	40,000	49,000	6,000
		101,20	91,000	10,000	40,000	65,000	4,000

\*Konfirmasyon iyonu

**DP:** Declustering Potential, **EP:** Entrance Potential, **CEP:** Cell Exit Potential, **CE:** Collision Energy, **CXP:** Collision Cell Exit Potential

**Spesifiklik/seçicilik (Specificity):** Boş numuneler, farklı standart maddeler yüklenerek analiz edildi; alıkonma sürelerinde herhangi bir girişim gözlenmedi. Analiz yönteminin seçicilik/duyarlılık açısından uygun olduğu sonucuna varıldı.

**Doğrusallık (Linearity):** Dört farklı konsantrasyon kullanılarak yapılan altı paralel analiz sonucunda her bir standart madde için kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Her standart maddenin kalibrasyon eğrisindeki  $r^2$  değeri 0,9954–0,9999 arasında bulundu (Tablo 4).

**Tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ):** Tespit limitini ve ölçüm limitini belirlemek için  $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$  konsantrasyonu kullanılarak 10 paralel analiz

yapılmıştır, Elde edilen sonuçlar Tablo 4'de gösterilmiştir. Oksitetrasiklinde  $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$  konsantrasyonlar tespit edilemediğinden tespit limiti olarak ikinci konsantrasyon noktası olan  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  konsantrasyondan elde edilen veriler kullanılmıştır.

**Doğruluk:** Doğruluk verileri, linearite ve geri kazanım çalışmalarından elde edilen verilerle hesaplanmıştır ve Tablo 4'de gösterilmiştir.

**Geri Kazanım:** Geri kazanımı belirlemek için 5, 10, 20 ve  $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$  konsantrasyonlar kullanılarak boş örneklerle yükleme yapılarak analizler gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Bal örneklerinde tespit limiti, hesaplama limiti, linearite, doğruluk ve geri kazanım oranları  
**Table 4.** Detection limit, quantification limit, linearity, accuracy and recovery in honey samples

Analitler	Tespit Limiti (LOD) ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Hesaplama Limiti (LOQ) ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Linearite ( $r^2$ )	Yükleme miktarı ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Ölçüm (ort) ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	RSD %	Doğruluk %	Geri Kazanım %
Dapson	6,14	8,54	0,9973	5	5,1	6,73	109	102,1
				10	10,28	11,04	91,6	102,78
				20	18,76	8,92	96,2	93,78
				40	37,80	7,18	103	94,5
Enrofloksasin	6,22	8,52	0,9954	5	5,23	6,28	93,7	104,64
				10	9,90	8,04	112	98,96
				20	18,35	6,94	92,4	91,76
				40	38,74	5,73	101	96,86
Eritromisin	8,24	12,74	0,9997	5	6,31	10,18	103	106,28
				10	9,31	11,07	97,1	93,06
				20	19,53	9,78	98,6	97,63
				40	36,16	6,43	101	93,39
Florfenikol	6,99	9,62	0,9954	5	5,86	6,41	102	117,23
				10	9,76	13,35	91,3	97,58
				20	22,17	11,00	110	110,85
				40	40,67	8,22	97,1	101,68
Kloramfenikol	5,43	6,34	0,9982	5	5,04	2,59	92,3	100,71
				10	11,08	6,10	109	110,83
				20	20,38	5,04	100	101,86
				40	40,04	3,71	98,7	100,11
Norfloksasin	6,52	9,12	0,9998	5	5,42	6,84	97,8	108,3
				10	10,18	2,87	101	101,83
				20	21,98	6,11	102	109,92
				40	39,70	3,45	99,0	99,25
Oksitetrasiklin	10,58	24,32	0,9987	10	10,58	12,98	92,1	105,83
				20	21,19	7,37	101	105,94
				40	43,38	14,71	101	108,46
Sulfakloropiridazin	6,59	9,79	0,9988	5	5,23	8,73	94,1	104,5
				10	10,22	7,78	107	102,2
				20	20,08	3,94	115	100,42
				40	40,53	5,48	99,0	101,32
Sulfadiazin	6,89	17,47	0,9999	5	6,89	15,34	119	107,9
				10	12,2	15,37	87,0	102
				20	17,83	10,36	86,9	89,17
				40	35,47	15,53	107	88,66
Sulfadimetoksin	5,47	7,04	0,9990	5	4,80	4,68	102	95,93
				10	10,12	2,97	101	101,16
				20	20,03	2,41	95,1	100,13
				40	39,60	3,42	102	99



Sulfadoksin	5,15	5,65	0,9982	5	4,94	1,45	97,4	98,73
				10	10,06	2,48	107	100,66
				20	20,23	3,24	94,6	101,14
				40	37,89	2,71	101	94,71
Sulfamerazin	5,93	8,37	0,9988	5	4,88	7,15	93,9	97,63
				10	9,91	4,18	105	99,12
				20	20,4	4,10	102	102
				40	41,05	5,26	98,1	102,63
Sulfametazin	5,46	8,23	0,9991	5	4,27	9,28	95,6	85,4
				10	10,40	7,28	107	103,99
				20	20,93	3,52	98,0	104,67
				40	38,75	2,76	99,9	96,88
Sulfametoksazol	5,29	7,26	0,9995	5	4,44	6,33	96,4	88,87
				10	9,20	5,90	104	91,95
				20	19,50	6,13	86,9	97,50
				40	40,84	4,80	99,4	102,11
Sulfapiridin	6,02	7,92	0,999	5	5,21	5,21	101	104,13
				10	9,94	5,20	99,0	99,38
				20	20,23	1,35	100	101,17
				40	39,57	1,26	100	98,92
Sulfaküinoksalin	6,22	8,32	0,9993	5	5,32	5,64	105	106,43
				10	10,38	1,87	94,5	103,83
				20	20,18	3,92	99,5	100,89
				40	38,88	2,79	101	97,21
Sulfatiazol	6,25	8,84	0,9994	5	5,14	7,18	104	102,87
				10	10,02	6,62	99,0	100,17
				20	19,46	3,92	94,3	97,28
				40	38,58	4,57	103	96,46
Tetrasiklin	7,89	13,94	0,9994	5	5,30	16,33	95,8	105,96
				10	9,18	10,20	105	91,78
				20	17,20	5,31	72,6	86
				40	36,32	6,97	99,3	90,79
Tilozin	5,74	7,94	0,9997	5	4,79	6,58	97,6	95,85
				10	10,05	5,95	101	100,51
				20	20,01	3,86	102	100,07
				40	39,77	3,17	99,0	99,43

## TARTIŞMA

Kıvrak ve ark tarafından bal örneklerinde 23 adet veteriner tıbbi ürün eşzamanlı olarak belirlemesi amacıyla ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile UPLC–ESI–MS/MS cihazı kullanılarak hızlı bir yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde üç farklı antibiyotik grubu (fenikol, sulfonamid ve tetrasiklin) kullanılmış, tespit limiti 0,14 ile 0,54  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  arasında belirlenmiştir, bizim geliştirdiğimiz metotta beş farklı antibiyotik grubundan (fenikol, sulfonamid, florokinolon, aminoglikosid, makrolid ve tetrasiklin) 19 veteriner tıbbi ürün için tespit limitleri 5,29 ile 10,58  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  arasındadır. Tespit limiti değerlerinin bizim değerlere göre daha düşük olması, kullanılan cihazın farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Kıvrak ve ark., 2016).

Havari ve ark. tarafından balda çoklu antibiyotik kalıntılarının (sülfonamidler, tetrasiklinler, makrolidler, linkozamidler ve aminoglikozitler) tayini için yeni, basit ve hızlı bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir.

Analitlerin geri kazanım oranları %85 ile %111 arasında değişmektedir. Karar limiti ( $CC_{\alpha}$ ) ve saptama limiti ( $CC_{\beta}$ ) 6 ile 9  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  arasında değişmektedir. Streptomisin 13  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ve neomisin 25  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  biraz daha yüksek limit tespit edilmiştir. Bizim metotta elde edilen tespit limitleri 5,29 ile 10,58  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  arasındadır. Tespit limitleri arasında önemli bir farkın olmadığı görülmektedir. Geri kazanım oranları %85,4 ile %117,23 arasında değerler, aynı çalışmanın geri kazanım değerleri ile paralel olduğu görülmektedir (Havari ve ark., 2017).

Louppis ve ark. tarafından geliştirilen metot, LC-MS/MS kullanarak baldaki antibakteriyel kalıntıların saptanması ve miktarının belirlenmesi için hızlı ve basit bir yöntemdir. Ekstraksiyon yöntemi bizim çalışmamıza benzer şekilde iki aşamalıdır. Geliştirilen metot, otuz altı farklı antibiyotik ve dört farklı aileden (sülfonamidler, tetrasiklinler, amfenikoller, florokinolonlar) ve bazı bireysel antibiyotikler (penisilin G, trimetoprim ve tiamulin) içindir. Karar limitleri ( $CC_{\alpha}$ ) 0,1 ile 9,2  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , tespit limitleri ( $CC_{\beta}$ )

## SONUÇ

0,3 ila 27,6 µg.kg<sup>-1</sup>, geri kazanım oranları %65,0 ile %116,1 arasındadır. Metot performans parametreleri ile çalışmamızın parametreleri ile arasında önemli bir fark olmadığı görülmektedir (Louppis ve ark., 2017).

Lopez ve ark. tarafından balda tetrasiklinler (klortetrasiklin, doksisisiklin, oksitetrasiklin ve tetrasiklin), florokinolonlar (siprofloksasin, danofloksasin, difloksasin, enrofloksasin ve sarafloksasin), makrolidler (tilozin), linkozamidler (lincomycin), aminoglikositler (streptomisin), sülfonamidlerin (sulfathiazol), fenikoller (kloramfenikol) ve fumagillin kalıntılarının tayini ve doğrulanması için sıvı kromatografi tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak çoklu bir yöntem geliştirilmiştir. Eritromisin (makrolid) ve monensin (iyonofor) saptanabilir ve doğrulanabilir ancak miktarı ölçülemez. Metodun doğruluk (accuracy) değerleri %65 ila %104 arasında ve varyasyon katsayı değerleri (RSD) %17'den düşüktür. Çalışmamızdaki doğruluk değerleri %86,9 ile %119 arasında, varyasyon katsayı değerleri %1,26 ile %16,33 olduğu ve bu çalışmaya benzer şekilde %17 den küçük olduğu görülmektedir (Lopez ve ark., 2008).

Vidal ve ark. tarafından balda farklı veteriner ilaç kalıntılarının (makrolidler, tetrasiklinler, kinolonlar ve sülfonamidler) ultra performanslı sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi (UPLC-MS/MS) ile eş zamanlı analizi için bir yöntem geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Ekstraksiyon yönteminde bizim metottan farklı olarak katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanmışlardır. Metodun ortalama geri kazanım değerleri, üç konsantrasyon seviyesinde (10, 50 ve 100 µg.kg<sup>-1</sup>), %70 ile %120, varyasyon katsayı değerleri %20'den az ve ölçüm limitleri (LOQ'lar) 4 µg.kg<sup>-1</sup> 'dan düşük olarak elde edilmiştir. Geri kazanım oranları ve varyasyon katsayı değerleri bizim metot verileri ile benzerlik göstermekte, ölçüm limitleri ise daha düşük olduğu görülmektedir. Bu çalışmada kullanılan cihazın, bizim çalışmamızda kullanılan cihazdan daha hassas olduğu düşünülmektedir (Vidal ve ark., 2009).

Wutz ve ark tarafından otomatik bir akış enjeksiyon sistemi ile birlikte yeniden üretilebilir antijen mikrodizilerini kullanarak bal örneklerinde antibiyotik türevlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için metot geliştirmişlerdir. Metot, mikrodizinin yüzeyine bağlı monoklonal antikorlar kullanan dolaylı bir rekabetçi immünoanaliz formatına dayanmaktadır. Geliştirilen metodun, geri kazanımlar oranları enrofloksasin (%92 ± %6), sülfametazin (%130 ± %21), sülfadiazin (%89 ± %20) ve streptomisin (%93 ± %4) yeterli olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen chemiluminescence metodu, bizim geliştirdiğimiz metottan farklı bir metottur (Wutz ve ark., 2011).

Sonuç olarak, iki farklı likit-liket ekstraksiyon metodu kullanılarak geliştirilen LC-MS/MS doğrulama analiz metodu, bal örneklerinde çoklu antibiyotik kalıntılarının tespit edilmesinde kullanılabilir. Geliştirilen metot, diğer katı faz ekstraksiyon metodlarına göre daha hızlı ve ekonomik, aynı zamanda altı farklı gruptan antibiyotikleri içeren doğrulama metodu olarak tarama ve doğrulama analizlerinde kullanılabilir.

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

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

**Finansal Destek:** --

**Yazarların Katkı Oranı:** Nurullah Özdemir, çalışmanın proje fikrine, tasarımına ve yürütülmesine katkıda bulundu, verilerin toplanmasına katkıda bulundu, verileri analiz etti, taslağı tasarladı ve yazdı, makaleyi eleştirel olarak inceledi. Yazar, son halini alan metni okudu ve onayladı.

## KAYNAKLAR

- Ball, D.W. (2007).** The chemical composition of honey. *Journal of Chemical Education*, 84(10), 1643. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed084p1643>
- Bargańska, Ż., Namieśnik, J., & Ślebioda, M. (2011).** Determination of antibiotic residues in honey. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(7), 1035-1041. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.02.014>
- Commission Regulation (CR). (2010).** No 37/2010 of 22 December 2009. Official Journal of the European Communities. 2010; L15: 1-72. doi:10.3000/17252555.L\_2010.015.eng [Erişim Tarihi:22.07.2023]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=OJ:L:2010:175:FULL&from=SL>
- Community Reference Laboratories (CRL). (2007).** Guidance Paper, CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans (7 December 2007). [Erişim Tarihi:22.07.2023]. [http://www.media-bank.co.kr/board\\_data/Erythromycin%20CRL%20guidance%202007.pdf](http://www.media-bank.co.kr/board_data/Erythromycin%20CRL%20guidance%202007.pdf)
- Chantawannakul, P., de Guzman, L.I., Li, J., & Williams, G.R.** Parasites, pathogens, and pests of honeybees in Asia. *Apidologie* 47, 301-324 (2016). <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0407-5>
- Chen, H., Chen, H., Ying, J., Huang, J., & Liao, L. (2009).** Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. *Analytica*

chimica acta, 632(1), 80-85.  
<https://doi.org/10.1016/j.ica.2008.10.068>

- Chiesa, L. M., Panseri, S., Nobile, M., Ceriani, F., & Arioli, F. (2018).** Distribution of POPs, pesticides and antibiotic residues in organic honeys from different production areas. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(7), 1340-1355.  
<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/19440049.2018.1451660?needAccess=true&role=button>
- El Hawari, K., Mokh, S., Doumyati, S., Al Iskandarani, M., & Verdon, E. (2017).** Development and validation of a multiclass method for the determination of antibiotic residues in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(4), 582-597.  
<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/19440049.2016.1232491?needAccess=true&role=button>
- Kivrak, I., KIVRAK, Ş., & Harmandar, M. (2016).** Development of a rapid method for the determination of antibiotic residues in honey using UPLC-ESI-MS/MS. *Food Science and Technology*, 36, 90-96.  
<https://www.scielo.br/j/cta/a/GqkpZ8mXfNpPhZ3jXqDS5Ls/>
- Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., L'Hostis, M., Wiest, L., ... & Pouliquen, H. (2013).** Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of Western France. *PloS one*, 8(6), e67007.  
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0067007>
- Lopez, M. I., Pettis, J. S., Smith, I. B., & Chu, P. S. (2008).** Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(5), 1553-1559.  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf073236w>
- Louppis, A.P., Kontominas, M. G., & Papastephanou, C. (2017).** Determination of antibiotic residues in honey by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 10, 3385-3397.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-017-0899-x>
- Mahmoudi, R., Norian, R., & Pajohi-Alamoti, M. (2014).** Antibiotic residues in Iranian honey by ELISA. *International journal of food properties*, 17(10), 2367-2373.
- Moretti, S., Saluti, G., & Galarini, R. (2017).** Residue Determination in Honey. In *Tech*. doi: 10.5772/67135  
<https://academic.oup.com/jaoac/article/92/3/975/5655938?login=false>
- Peres, G. T., Rath, S., & Reyes, F. G. R. (2010).** A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey. *Food control*, 21(5), 620-625.
- Resmî Gazete. (2017).** 07.03.2017 Tarih ve 30000 sayılı. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. [Erişim Tarihi:22.07.2023].  
<https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/03/20170307-4.htm>
- Reybroeck, W., Daeseleire, E., De Brabander, H. F., & Herman, L. (2012).** Antimicrobials in beekeeping. *Veterinary microbiology*, 158(1-2), 1-11.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113512000326>
- Salter, R. (2003).** Charm II system-comprehensive residue analysis system for honey. *Apiacta*, 38, 198-206.  
<http://charmdev-websitetestlink.charm.com/wp-content/uploads/2018/06/EX-0162.pdf>
- Varenina, I., Bilandžić, N., Luburić, Đ. B., Kolanović, B. S., Varga, I., Sedak, M., & Đokić, M. (2023).** Determination of quinolones, macrolides, sulfonamides and tetracyclines in honey using QuEChERS sample preparation and UHPLC-MS/MS analysis. *Food Control*, 148, 109676.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109676>
- Vidal, J. L. M., Aguilera-Luiz, M. D. M., Romero-Gonzalez, R., & Frenich, A. G. (2009).** Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1760-1767.  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf8034572>
- Wutz, K., Niessner, R., & Seidel, M. (2011).** Simultaneous determination of four different antibiotic residues in honey by chemiluminescence multianalyte chip immunoassays. *Microchimica Acta*, 173, 1-9.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-011-0548-9>
- Xu, J. J., An, M., Yang, R., Tan, Z., Hao, J., Cao, J., & Cao, W. (2016).** Determination of tetracycline antibiotic residues in honey and milk by miniaturized solid phase extraction using chitosan-modified graphitized multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(12), 2647-2654.  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.6b00748>
- Yang, Y., Lin, G., Liu, L., & Lin, T. (2022).** Rapid determination of multi-antibiotic residues in honey based on modified QuEChERS method coupled with UPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 374, 131733.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131733>

## Investigating Parasites of Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) by Fecal Examination in Samsun

Ali Tümay Gürler<sup>1\*</sup>, Coşkun Aydın<sup>2</sup>, Cenk Soner Bölükbaş<sup>1</sup>, Şakir Önder Türlek<sup>2</sup>, Mehmet Öztürk<sup>1</sup>, Rahşan Akpınar<sup>2</sup>, Tuğçe Tuysun<sup>1</sup>, Selma Kaya<sup>2</sup>, Elif Burcu Gençay Topçu<sup>1</sup>, Öykü Barılı<sup>1</sup>, Rubeyda Dinç<sup>1</sup>, Mustafa Açıcı<sup>1</sup>, Şinasi Umur<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Samsun

<sup>2</sup>Samsun Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü, Samsun

### ABSTRACT

Buffaloes, known to be resistant to environmental conditions and diseases, host many parasites. The study aimed to investigate the parasites of water buffaloes in Samsun by fecal examination methods. A total of 988 fecal samples (432 adult buffalo and 556 calves) were examined parasitologically. End of the study, 7 different helminth eggs (2 trematodes, 1 cestoda, and 4 nematodes) and *Eimeria* sp. oocysts were found in 70.9% of calves and 43.9% of adults. The common helminth eggs were trichostrongylid type, *Fasciola* sp., and *Moniezia* sp., while *Eimeria* sp. oocysts were recorded in 80% of 125 buffalo farms. There were no lungworm larvae in the samples. End of the study, at least one type of parasite was found in more than 90% of the buffalo farms. Although parasitic diseases are considered insignificant since intensive breeding has not yet been fully implemented in the buffalo sector in Turkey, it should need to control programs in the future.

**Keywords:** Fecal examination, Parasite, Water Buffalo, Samsun

\*\*\*

### Samsun Yöresi Mandalarında (*Bubalus bubalis*) Dışkı Bakısı ile Tespit Edilen Parazitler

#### ÖZ

Mandalar çevre şartlarına uyumlu, hastalıklara dayanıklı hayvanlar olarak bilinseler de birçok parazite konaklık yaparlar. Bu çalışmada Samsun ve ilçelerinde yetiştiriciliği yapılan mandalarda bulunan parazitlerin, dışkı bakısı yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır. Araştırma kapsamında 556'sı malak, 432'si ergin mandalara ait olmak üzere toplam 988 dışkı örneği parazitolojik yönden incelenmiştir. İnceleme sonunda 394 (%70,9) malak, 190 (%43,9) manda dışkısında 2 trematod (*Fasciola* sp. ve parafistomatid tip), 1 sestod (*Moniezia* sp.) ve 4 nematod (Rhabditid tip, trikostrongil tip, *Capillaria* sp., *Trichuris* sp.) olmak üzere 7 farklı helmint yumurtası, ayrıca *Eimeria* sp. oocistlerine rastlanmıştır. Dışkılarda en sık rastlanan helmint yumurtaları trikostrongil tip, *Fasciola* sp. ve *Moniezia* sp. olurken, *Eimeria* sp. oocisti incelenen 125 işletmenin %80'inde kaydedilmiştir. Akciğer kılkurdu larvalarına ise rastlanmamıştır. Araştırma sonunda, incelenen manda çiftliklerinin %90'ından fazlasında en az bir tür parazite rastlanmıştır. Türkiye'de mandacılık sektöründe entansif yetiştiriciliğe tam olarak geçilmediğinden parazit hastalıkları göz ardı edilse de, ileride bu hastalıklarla düzenli mücadele edilmesi gerektiği unutulmamalıdır.

#### Anahtar kelimeler: Dışkı bakısı, Manda, Parazit, Samsun

To cite this article: Gürler AT, Aydın C, Bölükbaş CS, Türlek ŞÖ, Öztürk M, Akpınar R, Tuysun T, Kaya SN, Gençay Topçu EB, Barılı Ö, Dinç R, Açıcı M, Umur Ş. Investigating Parasites of Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) by Fecal Examination. Kocatepe Vet J. (2023):16(4):472-480

Submission: 06.06.2023 Accepted: 01.11.2023 Published Online: 16.11.2023

ORCID ID; ATG: 0000-0001-8092-1245, ÇA: 0000-0001-6244-414X, CSB: 0000-0002-4863-696X, ŞÖT: 0000-0001-6970-8179, MÖ: 0000-0002-3559-0587, RA: 0000-0003-0075-9247, TT: 0000-0003-1262-1499, SK: 0000-0002-8934-3418, EBG: 0000-0002-0621-3125, ÖB: 0000-0001-7692-3125, RD: 0000-0003-1612-2187, MA: 0000-0002-8406-9739, ŞU: 0000-0001-9766-2817

\*Corresponding author e-mail: tgurler@omu.edu.tr

## GİRİŞ

Dünyada manda varlığının büyük çoğunluğu Asya kıtasında, geleneksel aile işletmelerinde bulunur. Ülkemizde de manda yetiştiriciliği benzer şekilde geleneksel olarak yapılmaktadır. Yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren dünyada gelişen teknoloji, ulaşım imkanlarının kolaylaşması, insan sayısındaki artış gibi faktörle gıda sektöründe birçok alanda üretim artmıştır. Manda yetiştiriciliği de benzer şekilde gelişmiş, manda ürünlerinin üretimi hızla artmış, entansif tesislere dönüşmüştür. Bunun bir sonucu olarak da dünya genelinde manda sayısı son 50 senede iki katına çıkmıştır. Ancak bu oran Türkiye’de neredeyse onda birine düşmüş, dünya manda varlığındaki oranımız %0,1’in altına gerilemiştir (Yılmaz ve Kara 2019). Devlet desteği altında, 2010’dan sonra “Halk Elinde Manda Islahı” projesi ile bir artış gözlenmiştir. Ancak son yıllarda üretim maliyetleri artmış ve 2022 yılı itibari ile bölgemizdeki manda varlığında ciddi bir düşüş olduğu tarafımızca gözlenmiştir. Bununla birlikte Türkiye coğrafi yapısı, geleneği, kültürü ve manda yetiştiriciliğindeki tarihsel tecrübesi ile büyük bir potansiyele sahiptir. Hayvancılık alanındaki gelişmeler ile birlikte manda yetiştiriciliği tekrar artacak ve ürünleri dünya piyasasındaki yerini alacaktır.

Mandalar zor çevre şartlarına uyum sağlayabilen, hastalıklara dayanıklı hayvanlar olarak bilinseler de birçok parazite ev sahipliği yaparlar. Türkiye’de yapılan araştırmalara bakıldığında (Tablo 1) 4 trematod, 5 sestod ve 17 nematod olmak üzere, mandalarda toplam 26 farklı helmint, 12 tür koksidiyoz etkeni bildirilmiştir.

Bu çalışmada, Samsun’da mandalarda bulunan parazitleri tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Araştırma kapsamında incelenen dışkıların bir kısmını, Samsun ve yöresinde malaklarda toksokariyozisin varlığını, yayılışını ve moleküler karakterizasyonun araştırıldığı TAGEM projesi (Proje No: TAGEM/HSGYAD/B/20/A5/ P1/1926) kapsamında toplanan dışkıları oluşturmaktadır. Bu nedenle bulgularda *Toxocara vitulorum* sonuçları verilmemiştir. Samsun’u temsilen manda yetiştiriciliğinin ön planda olduğu Bafra, Vezirköprü, Çarşamba, Ondokuzmayıs ve Ladik ilçelerinden örnekler toplanmıştır.

Çalışma materyalini, 2018 Mart-2022 Nisan tarihleri arasında, Samsun iline bağlı 125 işletmeden toplanan, 432’si ergin manda (1 yaşından büyükler), 556’ı malaklara (6 ayağa kadar) ait olmak üzere toplam 988 dışkı örneği oluşturmuştur. İlçelere göre örnek alınan işletme ve toplanan dışkı sayıları Tablo 2’de verilmiştir. Dışkılar manda işletmelerinde örnek alınacak bölmelerde ergin hayvan sayısı temel alınarak rastgele örnekleme yöntemi ile yerden alınmıştır. Malak dışkıları ise annesinden ayrı olarak tutulduğu bölmelerden, mümkün ise malak sayısı kadar toplanmıştır. Toplanan dışkılar üzerine basılmamış, fiziksel yapısı bozulmamış ve en taze olanlar arasından seçilmiştir. Yerden dışkı alınırken, dışkının ortasından el ayasının içini dolduracak kadar örnek alınmıştır. Eldiven dışkı içinde kalacak şekilde ters çevrilerek çıkarılmış ve ayrı bir poşet içerisine konulmuştur. Her işletmede örnek alınan bölme bilgileri ve kaçır örnek alındığı ayrı olarak kaydedilmiştir. Tüm örnekler laboratuvara getirilmiş ve mümkün olduğunca aynı gün içerisinde incelenmiştir. Aynı gün içerisinde incelenemeyen örnekler +4°C’de bir gece bekletildikten sonra ertesi gün incelenmiştir. Toplanan dışkılarda farklı helmint türleri bulunma ihtimali göz önünde bulundurularak trematod yumurtalarını tespit etmek için sedimentasyon; sestod ve nematod yumurtaları ile protozoon ookist ve kistlerini tespit etmek için flotasyon; akciğer kıl kurdu (*Dictyocaulus viviparus*) larva varlığının araştırılması için ise Baerman Wetzell yöntemi kullanılmıştır (Tinar ve ark. 2011). Akciğer kıl kurdu larvalarına, parazitin biyolojik döngüsü nedeniyle yalnızca ergin manda dışkılarında bakılmıştır. Işık mikroskopu altında incelenen örneklerde tespit edilen helmint yumurtalarının teşhisleri, morfolojik yapıları göz önüne alınarak ilgili literatür (Tinar ve ark. 2011) eşliğinde yapılmıştır. Yoğun *Eimeria* sp. ookisti bulunan dışkılardan rastgele seçilen bazı örnekler sporlandırılmış, enfeksiyondan sorumlu türlerin teşhisleri ışık mikroskopu altında morfolojik kriterleri temel alınarak yapılmıştır (Dubey 2020). Tüm sonuçlar kaydedilmiştir.



**Tablo 1.** Türkiye’de mandalarda bildirilen helmint türleri ve yayılışları  
**Table 1.** Helminths of buffalos and their prevalences in Turkey

	Parazit Türü	Yayılış	Kaynak	Parazit Türü	Yayılış	Kaynak
Trematod	<i>Calicophoron daubnei</i>	31-32,4	Çetindağ ve Doğanay	Paramphistomatidae	0,2*-5	Güzel ve Kozan 2013
	<i>Paramphistomum cervi</i>	2,2	1996; Ateş ve Umur 2021	<i>Fasciola</i> sp. <i>Fasciola hepatica</i>	6,6 5	
	<i>Fasciola gigantica</i>	+	Umur ve ark., 2018			
Sestod	<i>Cysticercus bovis</i>	0,6	Özer 1987	<i>Avitellina centripunctata</i>	+	Merdivenci 1983
	Kist hidatid	10	Güzel ve Kozan 2013	<i>Moniezia benedeni</i> <i>Moniezia expansa</i>	3,3 1,6	Umur ve Gıcık, 1995
	Alveolar kist	+	Merdivenci 1983			
Nematod	<i>Bunostomum phlebotomum</i>	4	Çetindağ ve Doğanay	<i>Paracooperia nodulosa</i>		Çetindağ ve Doğanay
	<i>Capillaria bovis</i>	20	1996	<i>Setaria cervi</i>	17	1996
	<i>Chabertia ovina</i>	1		<i>Ostertagia ostertagi</i>	10	
	<i>Gongylonema pulchrum</i>	28		<i>Trichuris discolor</i>	1	
	<i>Haemonchus contortus</i>	3		<i>Trichuris ovis</i>	1	
	<i>Oesophagostomum radiatum</i>	23			3	
	<i>Oesophagostomum venulosum</i>	4		<i>Setaria labiotapapillosa</i>	2	Güralp&Doğru 1968
	Trikostrongil tip	1,2*	Güzel & Kozan 2013	<i>Thelazia rhodesi</i>	1,2	Güralp ve Oğuz, 1970
	<i>Mecistocircus digitatus</i>	+	Merdivenci 1983	<i>Toxocara vitulorum</i>	3*	Çelik ve ark., 2022
	Koksidioz*	<i>Eimeria</i> sp.	75-95,4	Nalbantoğlu ve ark.	<i>E.canadensis</i>	5,1-20
<i>E.ankarensis</i>		9,9-16,7	2008; Sayın 1968	<i>E.cylindrica</i>	4,6-10,3	2008; Sayın 1968
<i>E.alabamensis</i>		10,3-11,5		<i>E.ellipsoidalis</i>	28,2-53	
<i>E.auburnensis</i>		43,8-44,9		<i>E.subspherica</i>	15,3-16,7	
<i>E.bovis</i>		34,4-44,9		<i>E.zuernii</i>	48,8-55,1	
<i>E.brasiliensis</i>		1,6-3,8				
				<i>E.nyomingensis</i>	0,7	Sayın 1968
<i>E.barielyi</i>		2-5,1	Nalbantoğlu ve ark. 2008; Sayın 1973	<i>Isoospora</i> sp.	46,2	Nalbantoğlu ve ark. 2008

\* Dışkı bakı sonuçları; + olgu bildirimini

**Tablo 2.** İlçelere göre dışkı toplanan işletme ve incelenen dışkı sayıları  
**Table 2.** Numbers of examined samples and buffalo farms according to district

İlçeler	Malak		Manda		Toplam	
	İşletme	Dışkı	İşletme	Dışkı	İşletme	Dışkı
Bafra	33	281	24	300	57	581
Çarşamba	13	81	6	46	19	127
Vezirköprü	18	60	10	55	28	115
Ondokuzmayıs	11	84	3	9	14	93
Ladik	5	50	2	22	7	72
<b>Toplam</b>	<b>80</b>	<b>556</b>	<b>45</b>	<b>432</b>	<b>125</b>	<b>988</b>

## BULGULAR

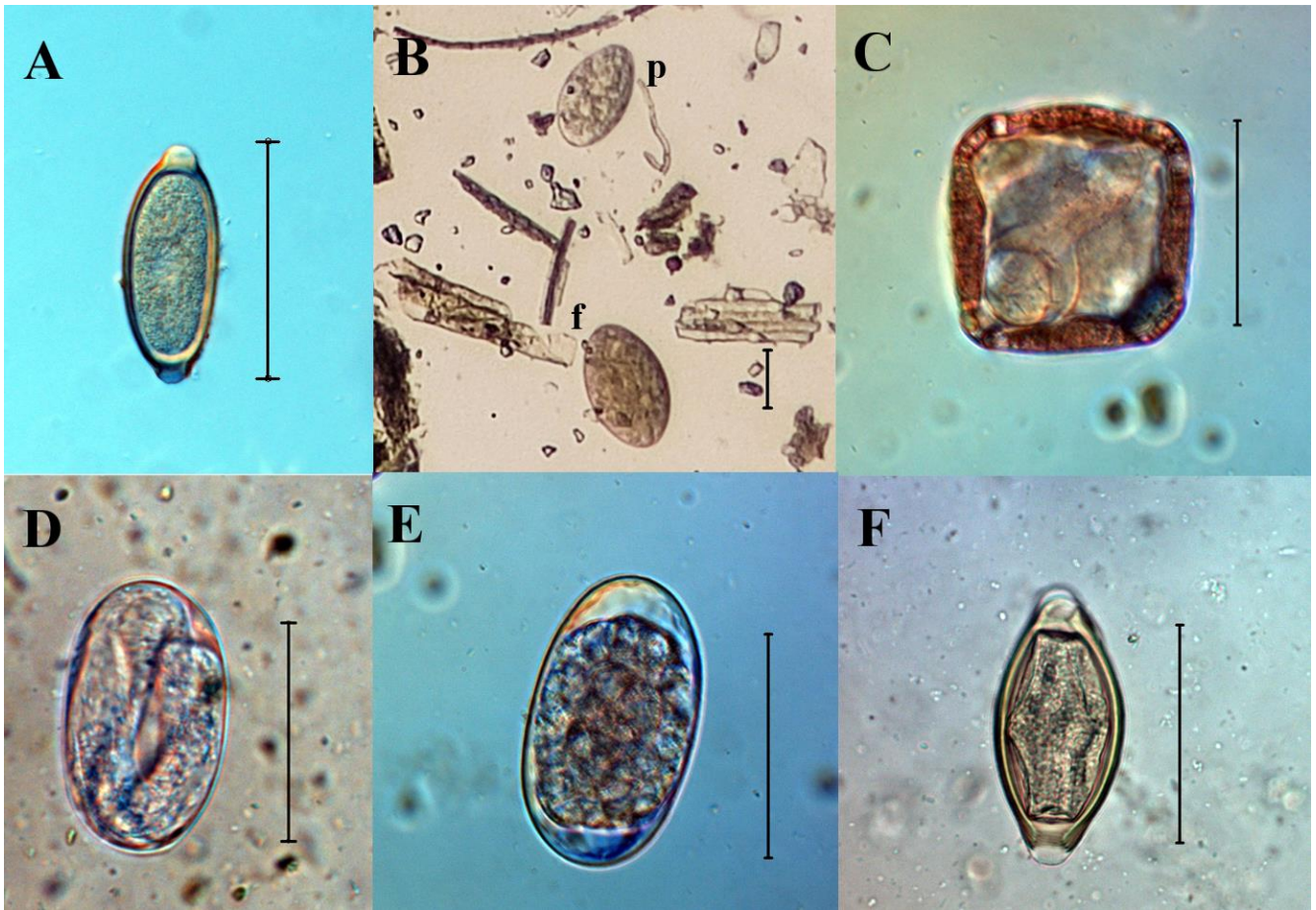
Dışkı bakısı yapılan 556 malaktan 394 (%70,9)’ünde, 432 ergin mandadan 190 (%43,9)’ında çeşitli parazit yumurta ve ookistlerine rastlanmıştır. Morfolojik yapılarına göre 2 trematod, 1 sestod ve 4 nematod olmak üzere 7 farklı helmint yumurtası, ayrıca *Eimeria* sp. ookistlerine rastlanmıştır. Manda ve malak dışkılarında tespit edilen helmint yumurtaları ve *Eimeria* sp. ookistlerinin, işletme ve dışkı sayısına göre yayılış oranları aşağıda Tablo 3’de, bulunan helmint yumurtaları Resim 1’de gösterilmiştir. Dışkı örneği alınan 5 ilçenin tümünde çeşitli helmint yumurta ve *Eimeria* ookistine rastlanmıştır, enfekte dışkı oranı

malaklarda %46,7-75,8, mandalarda %22,7-60,9 arasında değişmiştir. İlçelere göre teşhis edilen parazit cinsleri/türleri, yayılış oranları Tablo 4’de verilmiştir.

Pozitif örneklerde miks enfeksiyonlara da rastlanmıştır. Parazitolojik inceleme sonucunda, 423 dışkıda tek tür/cins parazit teşhis edilirken, 131 dışkıda 2, 29 dışkıda 3 ve 1 dışkıda 4 farklı tip parazit bulunmuştur (Tablo 5). *Eimeria* sp. ookisti pozitif olan bazı dışkılar sporlandırılmış ve mikroskopik inceleme sonucunda 6 farklı *Eimeria* türü tespit edilmiştir. Bu türler; *E. ankarensis*, *E. barielyi*, *E. bovis*, *E. ellipsoidalis*, *E. subspherica* ve *E. zuernii* olarak kaydedilmiştir. Bulunan *Eimeria* sp. ookistleri Resim 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 3.** Malak ve mandalarda bulunduğumuz parazitler ve yayılış oranları (%)  
**Table 3.** Parasites detected in calves and buffaloes and their prevalence (%)

Parazit türü	Malak		Manda	
	İşletme	Dışkı	İşletme	Dışkı
<i>Fasciola</i> sp.	-	-	11 (%24,4)	42 (%9,7)
Paramfistomatid tip	-	-	9 (%20)	29 (%6,7)
<i>Moniezia</i> sp.	10 (%12,5)	41 (%7,4)	4 (%8,9)	7 (%1,6)
Rabditid tip	5 (%6,6)	12 (%2,2)	1 (%2,2)	1 (%0,2)
Trikostrongil tip	30 (%37,5)	111 (%19,9)	24 (%53,3)	53 (%12,3)
<i>Capillaria</i> sp.	2 (%2,5)	3 (%0,5)	-	-
<i>Trichuris</i> sp.	6 (%7,5)	6 (%1,0)	-	-
<i>Eimeria</i> sp.	64 (%80,0)	333 (%59,9)	30 (%66,7)	107 (%24,8)



**Resim 1:** Dışkı bakısında bulunan helmint yumurtaları (Bar 50  $\mu$ m). **A.** *Capillaria* sp., **B.** *Fasciola* sp. (f) ve paramfistomatid tip (p), **C.** *Moniezia* sp., **D.** Rabditid tip, **E.** Trikostrongil tip, **F.** *Trichuris* sp.

**Figure 1:** Helminth eggs detected by fecal examination (Bar 50  $\mu$ m). **A.** *Capillaria* sp., **B.** *Fasciola* sp. (f) & paramphistomatid type (p), **C.** *Moniezia* sp., **D.** Rabditid type, **E.** Trichostrongylid type, **F.** *Trichuris* sp.

**Tablo 4.** İlçelere göre dışkı bakısında bulunan parazitler ve yayılış oranları (%)**Table 4.** Parasites in examined samples and their prevalence (%) by districts

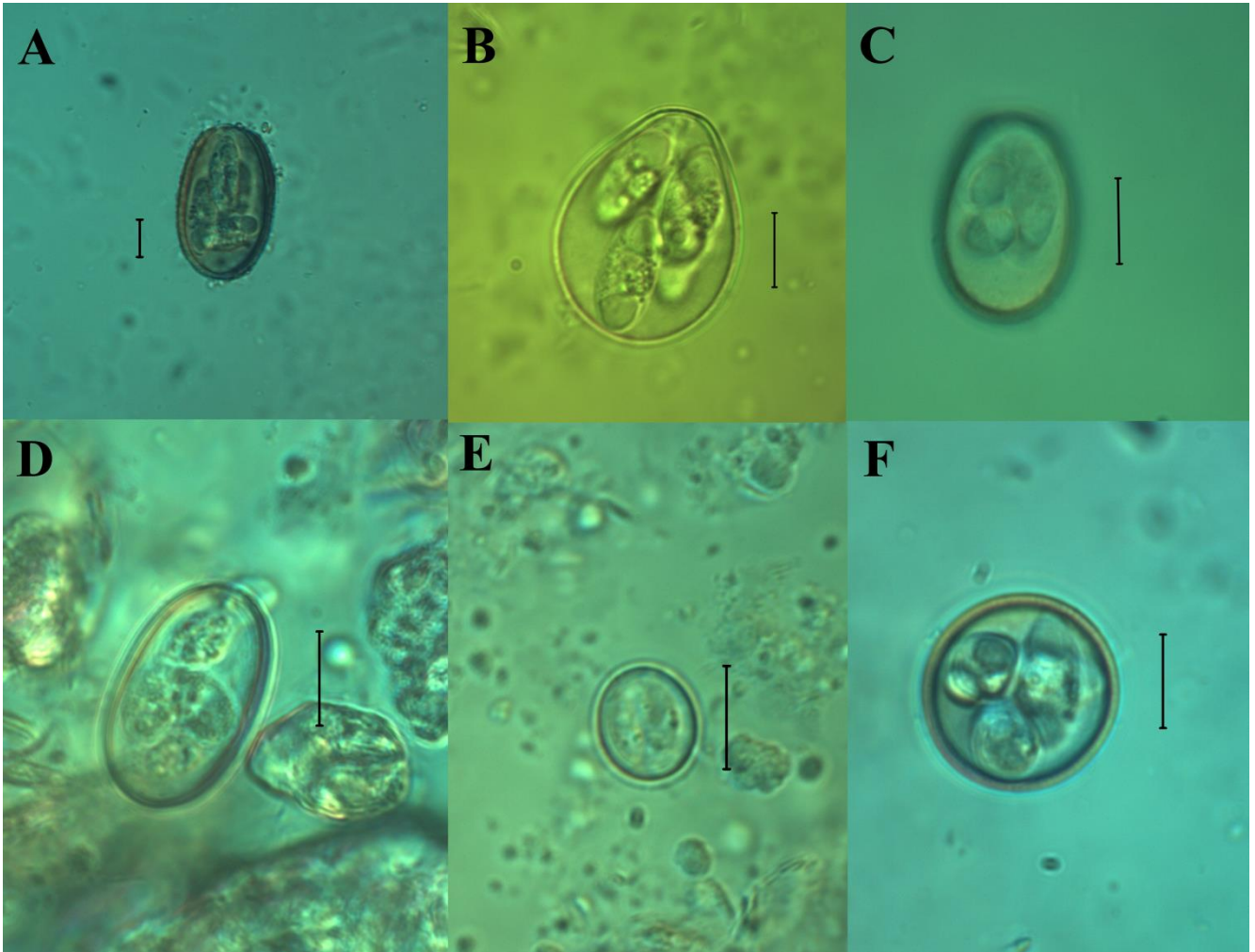
Parazit türü	<u>Bafra</u>		<u>Çarşamba</u>		<u>Ladik</u>		<u>Ondokuzma</u>		<u>Vezirköprü</u>	
	Mal*	Man*	Mal	Man	Mal	Man	Mal	Man	Mal	Man
<i>Fasciola</i> sp.	-	8,0	-	23,9	-	-	-	-	-	12,7
Paramfistomatid tip	-	6,3	-	-	-	-	-	-	-	18,2
<i>Moniezia</i> sp.	8,9	1,7	-	-	-	-	19,0	11,1	-	1,8
Trikostrongil tip	22,8	13,0	18,5	15,2	2	4,5	23,8	11,1	18,3	9,1
Rabditid tip	-	-	9,9	-	2	-	-	-	5	1,8
<i>Capillaria</i> sp.	0,4	-	-	-	4	-	-	-	-	-
<i>Trichuris</i> sp.	1,1	-	1,2	-	2	-	1,2	-	-	-
<i>Eimeria</i> sp.	73,3	25,3	66,7	30,4	62	18,2	39,3	44,4	15	16,7
<b>Enfekte dışkı</b>	<b>75,8</b>	<b>41,7</b>	<b>75,3</b>	<b>60,9</b>	<b>74</b>	<b>22,7</b>	<b>65,5</b>	<b>55,6</b>	<b>46,7</b>	<b>47,3</b>

\*Mal: Malak; Man: Manda

**Tablo 5.** Enfekte dışkılarda (n=584) tek ve miks enfeksiyon oranları**Table 5.** Single and mixed infection rates in infected samples (n=584)

Parazit	%	Parazit	%
<i>Eimeria</i> sp.	53,4	<i>Eimeria</i> sp. + Paramfistomatid tip	0,5
Trikostrongil tip	9,2	Trikostrongil tip + Paramfistomatid tip	0,5
<i>Fasciola</i> sp.	5,3	<i>Eimeria</i> sp. + <i>Trichuris</i> sp.	0,3
Paramfistomatid	2,2	<i>Eimeria</i> sp. + <i>Capillaria</i> sp.	0,3
<i>Moniezia</i> sp.	1,5	Trikostrongil tip + Rabditid tip	0,2
Rabditid tip	0,3	<i>Eimeria</i> sp.+ Trikostrongil tip + <i>Moniezia</i>	3,3
<i>Trichuris</i> sp.	0,2	<i>Eimeria</i> sp.+ Trikostrongil tip + Rabditid tip	0,5
<i>Capillaria</i> sp.	0,2	<i>Eimeria</i> sp.+ Trikostrongil tip + Paramfistomatid tip	0,3
<i>Eimeria</i> + Trikostrongil tip	13,5	Trikostrongil tip + Paramfistomatid tip + <i>Fasciola</i> sp.	0,3
<i>Eimeria</i> + <i>Moniezia</i>	3,1	<i>Eimeria</i> sp. + Paramfistomatid tip + <i>Fasciola</i> sp.	0,2
<i>Eimeria</i> + Rabditid tip	1,2	<i>Eimeria</i> sp. + Trikostrongil tip + <i>Trichuris</i> sp.	0,2
<i>Fasciola</i> + Paramfistomatid tip	1,0	<i>Eimeria</i> sp.+ <i>Moniezia</i> sp. + <i>Trichuris</i> sp.	0,2
Trikostrongil tip + <i>Fasciola</i> sp.	0,9	<i>Eimeria</i> sp.+Trikostrongil tip+ <i>Moniezia</i> sp.+ <i>Trichuris</i> sp.	0,2
Trikostrongil tip + <i>Moniezia</i> sp.	0,9		





**Resim 2:** Dışkı bakışında bulunan *Eimeria* türleri (Bar 10 µm). **A.** *E. ankarensis*, **B.** *E. barieli*, **C.** *E. bovis*, **D.** *E. ellipsoidalis*, **E.** *E. subspherica*, **F.** *E. zuernii*

**Figure 2:** *Eimeria* species detected by fecal examination (Bar 10 µm). **A.** *E. ankarensis*, **B.** *E. barieli*, **C.** *E. bovis*, **D.** *E. ellipsoidalis*, **E.** *E. subspherica*, **F.** *E. zuernii*

## TARTIŞMA

Dünya genelinde çalışmalara bakıldığında mandalarda gastrointestinal parazitlere sıklıkla rastlandığı görülmektedir. Bu araştırmaların büyük çoğunluğu manda popülasyonunun fazla olduğu Uzakdoğu ülkelerindedir. Bangladeş'te %61,0-84,9 (Biswas ve ark., 2014; Mamun ve ark., 2011), Laos'ta %18 (Gueguen ve ark., 2016), Hindistan'da %55,6-64,7 (Nath ve ark., 2016; Patel ve ark., 2015), Pakistan'da %39,8-79,5 (Raza ve ark., 2012), Çin'de nekropsi yapılan 359 bufalonun %61,8'inde gastrointestinal parazitlere rastlanmıştır (Liu ve ark., 2009). Avrupa'da yapılan araştırmalarda bu oran Polonya'da %44 (Kobak ve Pilarchzyk 2012), İtalya'da %33'ün üzerinde (Condoleo ve ark., 2007), Afrika kıtasında Mısır'da %10'un altında (Aboulaila ve ark. 2022) bulunmuştur. Türkiye'de ise mandalardaki gastrointestinal helmintlerin tespitine yönelik yapılan iki çalışmada Afyon'da 517 manda dışkısının 41 (%7,9)'inde, Samsun'da il mezbahasında kesilen 100 mandanın 78 (%78)'inde çeşitli helmintlere rastlanmıştır (Çetindağ ve Doğanay 1996; Güzel ve Kozan 2013). Ülkemizde

mandalarda koksidiyoz etkenleri ise %75,0-95,4 oranları arasında kaydedilmiştir (Nalbantoğlu ve ark. 2008; Sayın 1968). Bu araştırmada dışkı bakışı yapılan 988 malak/manda dışkısından 272 (%27,5)'sinde çeşitli helmint yumurtalarına, 440 (%44,5)'inde *Eimeria* sp. ookistine rastlanmıştır. Helmint sonuçlarına bakıldığında, bizim bulgularımız Çetindağ ve Doğanay (1996)'ın yaptığı çalışma ile aynı ilde yapılmış olmasına rağmen daha düşük çıkmıştır. Ancak bu araştırmada dışkı materyali incelendiğinden, sonuçların düşük çıkması normal olarak değerlendirilmelidir. Bununla birlikte Afyon'da yapılan dışkı bakı araştırmasına göre yüksek çıkmıştır. Burada mandaların farklı coğrafyalarda bulunması, farklı otlaklarda beslenmeleri gibi etkenlerin bu farkın oluşmasında rol oynayabileceği değerlendirilebilir. Koksidiyoz etkenlerinin sonuçları ise bu araştırmada daha düşük bulunmuştur. Bunda araştırmaların farklı yıllarda yapılmasının, antikoksidyal ilaç kullanma durumunun, farklı coğrafyalardan örnek alınmasının rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Ruminantların önemli patojenleri olan distomatoz etkenlerden *Fasciola* ve

Paramphistomatidae türlerine dünyada ve ülkemizde yaygın olarak rastlanmaktadır. Özellikle *F. gigantica*'nın mandalarda ölüme neden olduğu olgular bölgemizde bildirilmiştir (Umur ve ark. 2018). Uzakdoğu'da mandalarda yayılışlarının % 40'ın üzerine çıktığı (Biswas ve ark. 2014; Gueguen ve ark. 2016; Liu ve ark. 2009), Avrupa'da ise %1,3-7,1 arasında değiştiği görülmektedir (Condoleo ve ark. 2007; Kobak ve Pilarczyk 2012). Güzel ve Kozan (2013) Afyonkarahisar'da yaptıkları çalışmada, 517 manda dışkısının 19'unda (%6,6) *Fasciola* sp., 1'inde (%0,2) paramfistomatid tip yumurtaya rastladıklarını kadetmişlerdir. Ateş ve Umur (2021), Samsun'da yaptıkları tez çalışmasında mandalarda paramfistomatid tür olarak *Calicophoron daubneyi* bulunduğunu, yayılışının nekropsi sonuçlarına göre %32,4 olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada Avrupa'da yapılan dışkı bakı çalışmaları sonuçlarına benzer şekilde, *Fasciola* sp. yumurtası %9,7, paramfistomatid tip yumurta %6,7 oranlarında kaydedilmiş, trematod yumurtalarına yalnız ergin manda dışkılarında rastlanmıştır. Yalnız ergin manda sonuçlarına göre ise fasiolozisin %20'lerin üzerine çıktığı, bölgemizde Umur ve ark. (2018) belirttiği şekilde manda yetiştiriciliğini olumsuz etkileyen bir sorun olduğu görülmüştür. Diğer araştırma Afyon'da yapılmıştır (Güzel ve Kozan 2013). Bu araştırmanın yapıldığı il olan Samsun, Afyon'a göre daha fazla yağmur alır ve daha fazla sulak alana sahiptir. Bunun bir sonucu olarak da, distomatoz etkenlerin arakonakları olan salyangozların yaşam alanları Samsun ve civarında çok daha geniştir. Arakonak popülasyonunun fazla olması parazitin habitatta yaşama şansını ve etkenlerin ruminantlara bulaşma ihtimalini artırmaktadır. Bu durumun enfeksiyon sonuçlarını pozitif yönde etkileyeceği kanaatindeyiz.

Sestoda takımında bulunan parazitlerden mandalarda genellikle *Moniezia* türlerine rastlanmaktadır. Bu cins altında bulunan *M. expansa* ve *M. benedeni* Türkiye'de mandalarda bildirilmiştir (Umur ve Gıcık 1995). Bu iki türe dünya genelinde mandalarda Uzakdoğu'da %0,4-1,9 (Nath ve ark. 2016; Thakre ve ark. 2019), Avrupa'da %0,2-2,4 (Condoleo ve ark. 2007; Kobak ve Pilarczyk 2012) oranlarında rastlanırken, Türkiye'de nekropsi bakısına göre ergin mandalarda %1,6-3,3 arasında kaydedilmiştir (Umur ve Gıcık 1995). Bu çalışmada parazite ergin mandalarda benzer şekilde %1,6 oranında rastlanırken, malaklarda daha yüksek bir oranda (%7,4) bulunmuştur. Moneziozis ruminantlarda genel olarak bir yaşına kadar hayvanlarda görüldüğü için (Tınar ve ark., 2011) malaklarda daha yüksek çıkması beklenen bir sonuçtur. *Moniezia* türleri özellikle gelişme dönemindeki ruminantlarda büyüme geriliklerine neden olmakta, ayrıca hastalıklara karşı direnci azaltmaktadır. Bu nedenle, moneziozisin manda yetiştiriciliği açısından bölgemizde önemli problemlere neden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

İncelenen dışkılarda nematoda takımından 4 farklı yumurta tipi tespit edilmiştir. Bunlar arasında

trikostrongil tip yumurtaların daha fazla olduğu görülmüştür. Genel olarak ruminant yetiştiriciliği açısından çok önemli olan bu nematodlar yavrularda gelişim geriliklerine, erginlerde verim düşüklüğüne neden olurlar. Bunun yanında *Ostertagia* ve *Haemonchus* türleri ciddi klinik semptomlara, hatta ölümlere de neden olmaktadır (Tınar ve ark. 2011). Bu sebeple, trikostrongil tip yumurtaların, özellikle hayvanların otladığı alanlardaki kontaminasyon yoğunluğu yetiştiricilik açısından büyük önem arz eder. Mandalarda Trikostrongil tip yumurtalar Uzakdoğu'da %20'lerin üzerinde (Jyoti ve ark. 2012; Nath ve ark. 2016), Avrupa'da %5,4-10 gibi daha düşük oranlarda (Condoleo ve ark. 2007; Kobak ve Pilarczyk 2012), Türkiye'de ise dışkı bakısında % 1,2 oranında (Güzel ve Kozan 2013) bildirilmiştir. Nekropsi bulgularında Çin'de yapılan bir çalışmada *H. contortus* % 61,8 gibi çok yüksek bir oranda kaydedilmiş (Liu ve ark. 2009), Türkiye'de mandalarda *H. contortus* %3, *O. ostertagi* %1 (Çetindağ ve Doğanay 1996) oranlarında bulunmuştur. Bu çalışmada trikostrongil tip yumurtalara işletme bazında bakıldığında % 37,5-53,3 gibi yüksek oranlarda rastlanmıştır. Bu durum çalışmaların farklı zamanlarda yapılmasından kaynaklanabilir. Bununla birlikte sonuçlar mandaların otladığı alanlarda ve malakların tutulduğu bölmelerde trikostrongil tip yumurta kontaminasyonunun oldukça fazla olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, manda yetiştiriciliğinde bu parazitlere özellikle dikkat edilmesi gerekmektedir.

Dışkı örneklerinde tespit edilen diğer nematod yumurtaları *Trichuris* sp., *Capillaria* sp. ve rabditid tip olmuştur. Çetindağ ve Doğanay (1996) yaptıkları nekropsi incelemesinde *Capillaria bovis*'i %20 gibi oldukça yüksek bir oranda bildirmişler, ancak bu araştırma benzer coğrafyada yapılmasına rağmen aynı parazit bu çalışmada %0,3 oranında bulunmuştur. Aynı çalışmada *T. ovis*'i %3, *T. discolor*'u %1 oranlarında bildirilmiş (Çetindağ ve Doğanay 1996), bu çalışmada da benzer bir sonuç alınmıştır. Dışkı örnekleri rektumdan alınmadığı için tespit edilen rabditid tip yumurtalar *Strongyloides* sp. olarak kaydedilmemiştir. Bununla birlikte Türkiye'de yapılan çalışmalara bakıldığında, manda dışkısında *Strongyloides* sp. ya da rabditid tip yumurta kaydı olmadığı için, bu bulgumuz Türkiye'de ilk bildirim olarak sunulmaktadır.

Koksidiyozis yetiştiricilik açısından çok önemli bir problemidir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda mandacılık açısından önemi de ortaya konmuş, çoğunluğu sığırların koksidiyoz etkeni olarak bilinen 12 farklı tür teşhis edilmiş, genel yayılışı %75 olarak kaydedilmiştir (Nalbantoğlu ve ark. 2008; Sayın 1968, 1973). Bu çalışmada, özellikle malaklarda, yayılışı bazı ilçelerde %70'in üzerine çıkmış, işletme bazında bakıldığında ise bu oran %80'leri geçmiştir. Bilindiği üzere birçok işletmede malakların doğumu ve ilk ayları hala sulak alanlarda, yani insan kontrolü dışında olmaktadır. Bu durum koksidiyoz açısından esasen avantajlı bir durumdur, çünkü kapalı alanda yapılan yetiştiricilikte ookist birikimi arttığından, enfekte yavrularda ağır klinik bulguların görülme



ihimali de artmaktadır. Dolayısıyla mandacılığın gelişmesi ve entansif yetiştiriciliğe geçilmesi ile birlikte malakların kapalı alanlarda doğurtulma ve büyütülme oranları artacak, bu hayvanlar daha yüksek oranlarda ookist alımı ile karşı karşıya kalacaktır. Bu açıdan değerlendirildiğinde, buzağı yetiştiriciliğinde olduğu kadar önemli görülmeyen koksidiyoz, mandacılıkta da çok önemli paraziter bir enfeksiyon olarak karşımıza çıkacaktır.

## SONUÇ

Sonuç olarak, Türkiye’de manda varlığının en fazla olduğu il olan Samsun’da yapılan dışkı bakı çalışmasına göre, incelenen dışkı örneklerinde 7 farklı tip helmint yumurtasına ve 6 farklı tür *Eimeria* ookistine rastlanmıştır. Türkiye’de yapılmış çalışmalar ile karşılaştırıldığında parazit tür çeşitliliğinin korunduğu, yayılış oranlarının ise genel olarak arttığı görülmüştür. İleride Türkiye’de mandacılık tam olarak entansif yetiştiriciliğe döndüğünde, mandalar daha kısıtlı alanlarda yetiştirilecek ve bu parazitlerin oranları ve hayvanlara olan olumsuz etkileri artacaktır. Bu nedenle, manda yetiştiriciliğinde düzenli parazit kontrolünün yapılması ve mevsimsel kontrol-mücadele yöntemlerinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir.

**Conflict of interest:** The authors have no conflicts of interest to report.

**Authors’ Contributions:** ATG, CA, CSB, MA and ŞU contributed to idea, design and execution of the study. ATG, CA, ŞÖT, MÖ, and RD contributed to the collection of the materials. ATG, CA, CSB, ŞÖT, MÖ, RA, TT, SK, EBG, ÖB, RD, MA, and ŞU examined to the materials and identified the parasites. ATG and CA drafted and wrote the manuscript. ATG, CA, CSB, RA, SK, MA, and ŞU reviewed the manuscript critically. All authors have read and approved the finalized manuscript.

**Ethical approval:** In the study, only stool samples collected from the ground were used as material. 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 samples presented in this article were obtained within the framework of academic and ethical rules.

**Acknowledgement:** We thank the buffalo farm owners and staffers for their help during material collection.

**Explanation:** The study results have not yet been presented in any congress.

## KAYNAKLAR

Aboulaila, M., Igarashi, M., El-Khatam, A., & Menshaw, S. (2022). Gastrointestinal nematodes from buffalo in

Minoufia Govern with special reference to *Bunostomum phlebotomum*. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 27, e100613. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100673>

- Ateş, C., & Umur, Ş. (2021). Paramphistome species in water buffaloes and intermediate hosts in the Kızılırmak Delta in Samsun province, Turkey. *Acta Parasitologica*, 66, 213-221. <https://doi.org/10.1007/s11686-020-00278-z>
- Biswas, H., Dey, A.R., Begum, N., & Das, P.M. (2014). Epidemiological aspects of gastro-intestinal parasites in buffalo in Bhola, Bangladesh. *Indian Journal of Animal Science*, 84, 245-250.
- Condoleo, R.U., Venezian V., Bruni, G., Santaniello, M., Carbone, S., Pennacchio, S., Rinaldi, L., & Cringoli, G. (2007). Distribution of helminths in buffalo farms from central Italy. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 920-922. <https://doi.org/10.4081/ijas.2007.s2.920>
- Çelik, B.A., Çelik, Ö.Y., Ayan, A., Kılınç, Ö.O., Ayan, Ö.O., & Görmez, G. (2022). A survey of *Toxocara vitulorum* in anatolian water buffaloes (*Bubalis bubalis*) in Diyarbakır, Turkey. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 68, 90-96.
- Çetindağ, M., & Doğanay, A. (1996). Samsun yöresi mandalarında sindirim sistemi helmintleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 8(3), 46-57.
- Dubey J.P. (2020). *Coccidiosis in water buffaloes (Bubalis bubalis)*. Ed. Dubey J.P. *Coccidiosis in Livestock, Poultry, Companion Animals, and Humans*. CRC Press. s.91-98.
- Gueguen, E., Leperre, P., Petit, H., Marlin, A., & Chartier, C. (2016). A coproscopical study of helminthosis in domestic ruminants (cattle, buffalo, goat) in Khammouane Province (Lao PDR). *Revue de Medecine Veterinaire*, 67, 310-315.
- Güralp, N., & Doğru, C. (1968). Türkiye’de ehli hayvanlarda setariose. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1), 29-40.
- Güralp, N., & Oğuz, T. (1970). Türkiye’de mandalarda (*Bubalis bubalis*) thelaziose. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(2), 109-113.
- Güzel, H., & Kozan, E. (2013). The prevalence of helminth infections in water buffaloes in the vicinity of Afyonkarahisar province. *Euroasian Journal of Veterinary Science*, 29(3), 126-132.
- Jyoti, N., Singh, K., Juyal, P.D., Haque, M., & Rath, S.S. (2012). Epidemiology of gastrointestinal parasites in buffalo calves of Punjab state. *Journal of Veterinary Parasitology*, 26, 19-22.
- Kobak, P., & Pilarczyk, B. (2012). Prevalence of gastrointestinal parasites of water buffaloes raised in the Notecka Forest Region (Poland). *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 56, 33-36. <https://doi.org/10.2478/v10213-012-0006-4>
- Liu, Y., Li, F., Liu, W., Dai, R.S., Tan, Y.M., He, D.S., Lin, R.Q., & Zhu, X.Q. (2009). Prevalence of helminths in water buffaloes in Hunan Province, China. *Trop Anim Health Prod*, 41, 543-546. <https://doi.org/10.1007/s11250-008-9219-1>
- Mamun, M.A.A., Begum, N., & Mondal, M.M.H. (2011). A coprological survey of gastro-intestinal parasites of water buffaloes (*Bubalis bubalis*) in Kurigram district of Bangladesh. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 9, 103-109. <http://dx.doi.org/10.3329/jbau.v9i1.8752>
- Merdivenci, A. (1983). Son 30 yıl (1952-1982) içinde Türkiye’de varlığını ilk kez bildirdiğimiz parazitler. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 13, 23-37.
- Nalbantoğlu, S., Sarı, B., Çiçek, H., & Karaer, Z. (2008). Prevalence of coccidian species in the water buffalo (*Bubalis bubalis*) in the province of Afyon, Turkey. *Acta Veterinaria*

- Nath, S., Das, G., Dixit, A.K., Agrawal, V., Kumar, S., Singh, A.K., & Katuri, R.N. (2016).** Epidemiological studies on gastrointestinal parasites of buffaloes in seven agro-climatic zones of Madhya Pradesh, India. *Buffalo Bulletin*, 35, 355-364.
- Özer, E., 1987.** Elazığ yöresinde mandalarda *Cysticercus bonis*'in yayılışı üzerine araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 34(1), 85-88.
- Patel, H.C., Hasnani, J.J., Patel, P.V., Pandya, S.S., Solanki, J.B., & Jadav, S.C. (2015).** A study on helminth parasites of buffaloes brought to Ahmedabad slaughter house, Gujarat, India. *International Journal of Life Science & Pharma Research*. 5, 20-27.
- Raza, M.A., Bachaya, A.H., Akhtar, M.S., Arshad, M.H., Murtaza, S., Ayaz, M.M., Naeem, M., & Basit, A. (2012).** Point prevalence of gastrointestinal helminthiasis in buffaloes (*Bubalus bubalis*) at the vicinity of Jatoi, Punjab, Pakistan. *Science International (Lahore)*, 24, 465-469.
- Sayın, F. (1968).** The sporulated oocysts of *Eimeria ankarensis* n. sp. and of other species of *Eimeria* of buffalo in Turkey and transmission of four species of *Eimeria* from buffalo to cow calves. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15, 282-300.
- Sayın, F. (1973).** The presence of *Eimeria bareillyi* (Gill, Chhabra and Lal, 1963) in buffalo in Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20, 38-42.
- Thakre, B.K., Kumar, B., Brahmhatt, N., Parmar, V.L., Patel, J., Damor, J., Gamit, K., & Patel, J.A. (2019).** Gastrointestinal parasitic infections in cattle and buffaloes in southwestern region of Gujarat, India. *Indian Journal of Animal Science*, 89, 735-737.  
<https://doi.org/10.56093/ijans.v89i7.92022>
- Tınar, R., Umur, Ş., Köroğlu, E., Güçlü, F., Ayaz, E., & Şenlik, B. (2011).** *Veteriner Helmintoloji*. Ed: Tınar R, Dora Basım Yayın, Bursa.
- Umur, Ş., & Gıcık, Y. (1995).** Kars yöresi ruminantlarında Anaplocephalidae türlerinin yayılışı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 19(2), 272-281.
- Umur, Ş., Bölükbaş, C.S., Gürler, A.T., Sayılır, A.K., & Açııcı, M. (2018).** *Fasciola gigantica* cases in ruminants from Samsun Province, Turkey. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 13, 1-4.
- Yılmaz, A., & Kara, M.A. (2019).** Dünyada ve Türkiye'de manda yetiştiriciliğinin durumu ve geleceği. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 6(3), 356-363.  
<https://doi.org/10.19159/tutad.598629>

## The Effect of Adding Herbal Extract Blend to the Rations of Quails at Different Stocking Density on Performance, Meat Quality and Some Oxidative Stress Parameters

Meltem ÖZTÜRK AYDIN<sup>1\*</sup>, Özcan CENGİZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, Türkiye

### ABSTRACT

The effect of adding herbal extract to rations of quails raised at different stocking densities on performance, meat quality and some oxidative stress parameters was investigated. A total of 585 5-day-old mixed-sex Japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*) were used. A 3x2 experimental design was implemented, and the effects of stocking density (100 cm<sup>2</sup> /animal and 200 cm<sup>2</sup> /animal) and the herbal extract (0, 100 and 200 mg/kg) were examined by creating 5 replicates in 6 different experimental groups. Quail chick starter (24% CP and 2900 kcal/kg ME) and grower (22% CP and 2900 kcal/kg ME) rations were given to birds as ad libitum. The performance data were determined on a weekly basis, such as body weight (BW), body weight gain (BWG), feed consumption (FC) and feed conversion ratio (FCR), while meat quality, carcass yield and oxidative stress parameters (MDA, SOD, corticosterone, H/L ratio) were determined from samples taken by slaughtering on the 35th day of the experiment. The results; High stocking density (HSD), decreased BW on day 14 (64,15 vs 62,41 g; P<0,027), day 21 (111,02 vs 107,84 g; P<0,018) weighings. Decrease in FC was occurred between days 14-21 (104,39 vs 99,17 g; P<0,006), 28-35 (165,9 vs 145,83 g; P<0,002), and depression in FCR at days 21-28 (2,19 vs 2,55 g; P<0,031), 28-35 (2,29 vs 3,29 g; P<0,002) and 14-35 (2,10 and 2,64g; P<0,001) was measured. HSD increased the cooking loss significantly (P<0,003); while herbal extract additive increased (P<0,031) only the meat color L\* value and had no effect on other parameters.

**Key words:** Herbal extract, meat quality, quail, stocking density

\*\*\*

### Farklı Yerleşim Sıklığında Yetiştirilen Bildircinlerin Rasyonlarına Bitkisel Ekstrakt Karışımı Katılmasının Performans, Et Kalitesi ve Bazı Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkisi

### ÖZ

Çalışmada farklı yerleşim sıklığında yetiştirilen bildircinlerin rasyonlarına bitkisel ekstrakt katılmasının performans, et kalitesi ve bazı oksidatif stres parametreleri üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmada 585 adet 5 günlük yaşta karışık cinsiyetteki Japon bildircin civcivi (*Coturnix coturnix japonica*) kullanılmıştır. 3x2 deneme düzeni oluşturulmuş olup yerleşim sıklığı (100 cm<sup>2</sup> /hayvan ve 200 cm<sup>2</sup> /hayvan) ve bitkisel ekstrakt karışımının (0, 100 ve 200 mg/kg) etkileri incelenmiştir. Etlik bildircin civcivi büyütme (%24 HP ve 2900 kcal/kg ME) ve geliştirme (%22 HP ve 2900 kcal/kg ME) rasyonları hayvanların tüketimine ad libitum olarak sunulmuştur. Araştırmada performans verileri canlı ağırlık (CA), canlı ağırlık artışı (CAA), yem tüketimi (YT) ve yemden yararlanma oranı (YYO) haftalık olarak belirlenirken, denemenin 35. gününde kesim işlemi uygulanarak alınan örneklerde et kalitesi, karkas verimi ve oksidatif stres parametreleri (MDA, SOD, kortikosteron, H/L oranı) incelenmiştir. Sonuç olarak; araştırmada yüksek yerleşim sıklığı oluşturulan gruplarda 14. (64,15 ve 62,41 g; P<0,027) ve 21. gün (111,02 ve 107,84 g; P<0,018) yapılan tartımlarda CA baskılanırken, çalışmanın 14-21. günleri arasında (104,39 ve 99,17 g; P<0,006) ve 28-35.günleri arasında (165,9 ve 145,83 g; P<0,002) YT'de azalma, 21-28.günleri arasında (2,19 ve 2,55 g; P<0,031), 28-35.günleri arasında (2,29 ve 3,29 g; P<0,002), 14-35. günleri arasında (2,10 ve 2,64 g; P<0,001) YYO olumsuz etkilenmiştir. Çalışmada yerleşim sıklığı yüksek pişirme kaybını arttırdığı (P<0,003) saptanırken; bitkisel ekstrakt katkısının ise sadece et rengi L\* değeri arttırdığı (P<0,031) ve diğer parametreler üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Bildircin, bitkisel ekstrakt, et kalitesi, yerleşim sıklığı

To cite this article: Öztürk Aydın M. Cengiz Ö. The Effect of Adding Herbal Extract Blend to the Rations of Quails at Different Stocking Density on Performance, Meat Quality and Some Oxidative Stress Parameters. Kocatepe Vet J. (2023) 16(4):481-490

Submission: 07.03.2023 Accepted: 26.10.2023 Published Online: 27.11.2023

ORCID ID; MÖA: 0000 0002 0813 5693, ÖC: 0000 0001 9526 8656

\*Corresponding author e-mail: [meltem.ozturk@adu.edu.tr](mailto:meltem.ozturk@adu.edu.tr)

## GİRİŞ

İnsanların beslenmesinde protein hem sağlık hem de büyüme açısından önemli bir yere sahiptir. Bu amaçla hayvansal proteinin üretimini artırmak için bir taraftan eldeki kaynaklar kullanılırken, bir taraftan da alternatif hayvansal protein kaynaklarının araştırması devam etmektedir. Tüketicilerin beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler, besleyici ve lezzetli olan etlere ilginin artmasını sağladığı gibi; bildırcın, sülün veya devekuşu gibi kanatlı eti tüketiminde de artışa neden olmaktadır. Bildırcın Uzak Doğu ve Asya ülkelerinde yumurta üretimi için yetiştirilirken, Avrupa ve Amerika gibi ülkelerde ise et üretimi için yetiştirilmektedir. Bildırcın ülkemizde ise son 15 yıldır önem kazanıp kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde yer edinmeye başlamıştır (Mlynek ve ark., 2016). Bu bağlamda özellikle son yıllarda kanatlı hayvan yetiştiriciliği konusunda bildırcın ile yapılan çalışmaların sayısı hızla artmaktadır (Nazlıgül ve ark., 2001; Kılıç 2005; Yurdakul 2006). Bu amaçla, bildırcınlarda farklı dönemlerde (başlangıç, büyütme) performans verilerinin iyileştirilmesi yönelik araştırmalar yapılmaya devam etmektedir (İnci ve ark., 2015).

Bu kapsamda rasyonlara bitkisel ekstrakt ilavesi yapılmakta ve olumlu yönde etkiler alındığı bildirilmektedir. Bitkisel ekstraktlar özellikle yemin duysal özelliklerini iyileştiren, hayvanların performanslarını olduğu kadar bu hayvanlardan elde edilen ürünlerin kalitesini de geliştiren, antimikrobiyel, antioksidan, antistres, büyümeyi uyarıcı gibi etkileri olan, yemin lezzet ile aromasını artıran ve sindirim kanalı işlevlerine olumlu yönde etkileyen bitkilerden elde edilen bir yem katkı maddesidir (Lange 2005; Tıpu ve ark., 2006). Ayrıca bitkisel ekstraktlar kurutulmuş bitkilerden, özel ekstraksiyon yöntemi ve ayrıştırma işlemleri yapıldıktan sonra elde edilen bitki özleridir (Çetin 2012). Ekstraktların bakteriostatik etkileri ve bağışıklık sistemini güçlendirici özelliklerinden dolayı son yıllarda kanatlı işletmelerinde kullanımları yaygınlaşmıştır (Kahraman 2009). Ayrıca kanatlı yetiştiriciliğinde hayvanlar birçok stres faktörü (yerleşim sıklığı, sıcaklık stresi gibi) ile karşılaştığından dolayı organ ve hücrelerindeki fizyolojik stresi önlemek amacıyla bitkisel ekstraktlar kullanılmaktadır. Ayrıca bitkisel ekstraktların bileşimlerinde yer alan fenolik bileşiklerle oksidatif stabiliteyi artırdığı ve stresin olumsuz etkilerini önlediği bildirilmektedir (Basmacıoğlu ve ark., 2004). Sindirim sistemindeki enzimlerin maksimum aktiviteleri için gerekli olan pH'yı dengeleme açısından da bitkisel ekstraktların önemli görevleri vardır (Windisch, 2008).

Bitkisel ekstraktların kanatlı rasyonlarında kullanımına bakıldığında karma yemlerine erken gelişim dönemlerinde ilave edilmesi daha iyidir. Bunu sebebi kuluçkadan çıkan civcivlerin bağışıklık sistemleri yeterince gelişmediği için erken dönemde iyi beslenmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle rasyona bitkisel ekstraktların katkısı YT'nin teşvik edilmesi

hem de sindirim enzimlerinin aktive olması açısından önemlidir (Kahraman, 2009). Bitki türlerinin yapılarındaki aktif bileşenlerin çeşitliliği, bitkisel ekstraktların aynı zamanda sindirim kanalına olan etkileri açısından da bazı ayrıcalıkları beraberinde getirir. Pek çoğu tükürük salgısını uyarır. Zerdeçal, arnavut biberi, zencefil, anason, nane, soğan ve kimyon gibi bitkisel ekstraktlar lipitlerin sindirim ve emiliminde yararı olan safra asitlerinin karaciğerde sentez ve salınımını arttırırken, pankreas enzimlerini (lipazlar, amilazlar gibi) uyarır ve aynı zamanda, mide mukozasında yer alan sindirim enzimlerinin aktivitesini de arttırır (Adıyaman ve Ayhan, 2010). Bununla beraber bazı bitkisel ekstraktlar ise (sarımsak, kekik, biberiye, karanfil ve tarçın gibi) E.Coli, Salmonella, Clostridium gibi patojen mikroorganizmaların gelişimini durdurarak performans verileri üzerine olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir ve bu sebeplerle kanatlı rasyonlarına ilave edilmektedir (Karasu ve Öztürk, 2014).

Kanatlılarda stres faktörlerine baktığımızda ise en önemlilerinden bir tanesi yüksek yerleşim sıklığıdır. Genellikle yerleşim sıklığının artırılması ile büyüme oranındaki azalmanın sebebi sıcaklık stresinin bir sonucu olarak büyümenin baskılanmasıdır (Yadgari ve ark., 2006). Yerleşim sıklığı ne kadar fazla olursa, et üretimi o kadar azalır, bacak rahatsızlıkları o kadar artar ve kanibalizme sebep olur (Arslan, 2012). Birim alana konulan hayvan sayısının fazla olması hastalık ve stres riskini de artırdığı için CA, CAA, YT ve YYO'nında gerilemeye ve et kalitesinde düşüslere neden olmaktadır. Birim alana konulan hayvan sayısını azalttığımızda ise işletme açısından ekonomik kayba sebep olmaktadır. Yerleşim sıklığının fazla oluşu çevre sıcaklığının artışına, hava akımının azalmasına, vücut ısısının dışarıya çıkmamasına, havalandırmanın kötü olmasına, amonyağın artmasına buna bağlı YT'nin azalması aynı zamanda yem ve suya erişimin zorlaşmasına ve dolayısıyla performans verilerinin düşmesine neden olmaktadır (Seven ve ark., 2013). Aynı zamanda kafes içi altlık kalitesinin bozulmasına, buna bağlı havalandırma problemine, ölüm oranı ve yaralanma artışına, kötü tüylenme, göğüste kabarcık (breastblister) ve karında su toplaması gibi olaylarda artışa sebep olmaktadır (Arslan, 2012). Bildırcın yetiştiriciliğinde birim alana konulacak hayvan sayısı belirlenirken en ekonomik olanı tercih etmek gerekir. Birim alana konulan hayvan sayısı ne fazla ne de az olmalıdır. Bu sebeple kafeslere konulacak hayvan sayısının belirlenirken genel kriter, kafeslerin doğal havalandırması ya da çevre kontrollü olmasına bağlı olarak sırasıyla 25 kg CA/m<sup>2</sup> ve 35 kg CA/m<sup>2</sup> şeklinde olabilir ya da yumurtlama döneminde bir bildırcın için 130–150 cm<sup>2</sup> taban alanı olarak belirlenebilir (Yadgari ve ark., 2006). Bitkisel ekstraktlar stres faktörlerini bağlı bu olumsuzluklarına ortadan kaldırmak amacıyla rasyonlara ilave edilmektedir.

Çalışmada etlik bildircin yetiştiriciliğinde uygulanan yerleşim sıklığının olası olumsuz etkileri ve bunları ortadan kaldırmak için rasyona ilave edilen bitkisel ekstraktın büyüme performans, karkas özellikleri, et kalitesi ve bazı kan parametreleri üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

## MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada 585 adet 5 günlük yaşta Japon bildircin civcivi (*Coturnix coturnix japonica*) kullanıldı ve civcivler özel bir üretim firmasından temin edilip, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Kanatlı Araştırma Birimi'ne getirildi ve deneme burda gerçekleştirildi. Araştırmada 5-14. gün civciv büyüme ve 15-35. gün civciv geliştirme rasyonu verildi Bu rasyonlar izonitrojenik ve izokalorik olarak hazırlanmış olup ve sırasıyla %24 ve %22 HP ile 2900 kcal/kg ME içermektedir (NRC, 1994). Araştırma 3x2 deneme deseninde oluşturulmuş olup, iki farklı yerleşim sıklığı (100 cm<sup>2</sup>/hayvan ve 200 cm<sup>2</sup>/hayvan) altında yetiştirilen bildircinlerin rasyonlarına üç farklı düzeyde (0, 100 ve 200 mg/kg) bitkisel ekstrakt karışımı ilavesinin etkileri incelendi. Bitkisel ekstrakt karışımı olarak Impextraco (Belçika) firmasına ait E Life (%32,5 bitkisel ekstrakt karışımı, %67,5 sefilyolit) adındaki ticari ürün katıldı. Üründe yer alan bitkisel ekstraktların karışımı enginar, zeytin, kırmızı soğan, böğürtlen, domates, karpuz, nar, kekik, biberiye ve zencefilden elde edilmiştir. 100 cm<sup>2</sup>/hay deneme grubu için her birinde 26 hayvan bulunan 5 tekrar grubu, 200 cm<sup>2</sup>/hay deneme grubu için her birinde 13 hayvan bulunan 5 tekrar grubu oluşturuldu. Araştırma için 5 günlük yaşta sağlanan toplam 585 adet bildircin 14 günlük oluncaya kadar denemenin adaptasyon kafeslerinde kontrol grubu (temel diyet) rasyonları ile beslendi ve hayvanlar 14 günlük olduklarında yerleşim sıklığı yüksek olan kafes bölmelerine alındı. Araştırmanın 14. gününden itibaren deneme rasyonları verilmeye ve yerleşim sıklığı uygulanmaya başlandı. Civcivler boyutları 25x44x30 cm olan ve içinde deneme süresince aynı konumda ve sayıda ısıtıcı, yemlik, suluk bulunan civciv büyüme kafeslerinde barındırıldı. Hayvanların yemleme işlemleri her bir kafes bölmesindeki plastik yemliklerle sağlanmış ve su ise damlalıklı sulama sistemi ile ad libitum olarak verildi. Aydınlatma günde 24 saat devamlı olacak şekilde ampullerle sağlandı. Çalışmanın ilk günlerinde ortam sıcaklığı 35-37°C olarak sağlandı ve daha sonra sıcaklık azaltılarak çalışmanın 14-35. günler arasında 25-27°C'ye kadar düşürüldü. Deneme süresince ölüm oranı %1'in altında tespit edildi. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26.02.2019 tarih ve 2019/023 sayılı onayı ile gerçekleştirildi.

### Performans Verilerinin Belirlenmesi

14. günden başlayarak 21, 28 ve 35. günlerde her grubun alt grupları ayrı ayrı tartımlar yapılarak

ortalama CA belirlendi ve yapılan haftalık tartımlar arası farkın o gruptaki hayvan sayısına bölümü ile CAA'ı hesaplandı. YT, YYO ise haftalık olarak yemliklerde kalan yem miktarı, o hafta içinde her alt gruba verilen toplam yem miktarından çıkartılıp o hafta içerisinde tükettiği yem miktarı bulundu. Bu miktar o haftada ölen hayvanlar göz önüne alınarak mevcut hayvan sayısına bölünüp alt grup ortalaması olarak hayvan başına YT'leri hesaplandı. YYO ise iki tartım aralığında tükettikleri ortalama yem miktarı, yine bu iki tartım aralığında belirlenen ortalama CAA bölünerek hesaplandı.

### Et Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi

Denemenin 35. gününde deneme gruplarındaki her bir tekrardan 4'er hayvan (her bir deneme grubundan 20, toplam 120 adet) belirlenerek dekapitasyon işlemi uygulanarak kesildi ve örnek (göğüs eti) alındı Göğüs eti +4 °C'de 24 saat bekletildikten sonra, kaynayan su banyosunda iç ısıları 75 °C olana kadar pişirildi. Pişirme sonrası et örnekleri akan su altında soğutulup, poşetlerinden çıkarılarak kağıt bir havluyla kurutulup tekrar tartıldı. Pişirme kaybı, et örneklerinin pişirme öncesi ve sonrası ağırlıkları arasındaki farkın başlangıç ağırlığına oranı olarak hesaplandı (Honikel 1998).

Etin pH (kesimden sonra 15 dk ve +4 °C'de 24 saat bekletildikten sonra) ölçümleri sol göğüsteki üç farklı bölgeden cam elektrotlu bir pH metre kullanılarak bulundu ve bu değerlerin ortalaması alınarak etlerin pH değeri hesaplandı.

Et rengi kesimden 24 saat sonra soğuk karkaslardan ayrılan derisiz göğüs etleri üzerinde ölçüldü. Et rengi ölçümü için L\*, a\* ve b\* koordinat sistemine göre ölçüm yapan Minolta CR400 renk ölçüm cihazı kullanıldı.

### Kan Parametrelerinin Belirlenmesi

Kan parametrelerini incelemek amacıyla her bir tekrardan ikişer hayvandan (her bir deneme grubundan 10, toplam 60 adet) kan örneği toplandı. Biyokimyasal kan parametrelerinin belirlenmesi için tüplere alınan kan örnekleri santrifüje edilerek serumları çıkartılıp, serum MDA düzeyinin ölçümünde Yoshioka ve ark. (1979)'nın bildirdiği yöntemden yararlandı. Kan kortikosteron düzeyleri ticari kitler (Cayman Chemical Company, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak spektrofotometrik (Hitachi Ltd., Tokyo Seri No: 1238-23) olarak, SOD düzeyleri ise Wheeler ve ark. (1990) bildirdiği yöntem kullanılarak belirlendi.

Heterofil/Lenfosit oranı belirlenmesi için hayvanların kesimi sırasında EDTA'lı tüplere 10'ar ml kan alınarak plazmanın ayrılması için 3000 devirde 10 dakika santrifuj edildi ve sürme frotisi yapılarak Pappenheim panoptik boyama yöntemi (May Grunwald-Giemsa) ile boyandıktan sonra her bir örnekte 100 lökosit sayılarak heterofil/lenfosit oranı belirlendi (Gross ve ark., 1983).



Araştırmada elde edilen verilerden CA, CAA, YT, YYO, karkas randımanı, et kalitesi özellikleri (pH, et rengi değerleri ( $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$ ), pişirme kaybı) ve kan parametreleri için GLM (General Linear Model) prosedürü kullanılarak SPSS 22 (Inc., Chicago, II, USA) paket programı istatistik analizleri yapıldı. Farkların önem kontrolü için ise Duncan Testi uygulandı (Özdamar, 1999).

Denemenin 14 ve 21. günlerinde 100 cm<sup>2</sup>/hayvan olan grupta CA değerleri sırasıyla 62,41 g ve 107,84 g iken, 200 cm<sup>2</sup>/hayvan olan grupta ise 64,15 g ve 111,02 g olarak saptandı. Bu veriler CA'nın yerleşim sıklığının yüksek olduğu gruplarda önemli düzeyde ( $p < 0,05$ ) azaldığını göstermektedir. Denemenin 28. ve 35. günlerinde ise CA değerlerinin azalmasına karşılık bu farkın istatistik olarak önemli olmadığı belirlendi. CA değerlerine ilişkin veriler Tablo 1'de sunuldu. Çalışmada yerleşim sıklığı ve bitkisel ekstrekt ilavesinin CAA değerleri üzerine ise istatistiksel açıdan önemli bir etkisinin olmadığı saptandı.

**Tablo 1.** Yerleşim sıklığı ve bitkisel ekstrekt ilavesinin Canlı Ağırlık (CA) ortalamaları üzerine etkisi  
**Table 1.** The effect of stocking density and herbal extract supplementation on Body Weight (BW) averages

Gruplar	n	14. gün (g)	21. gün (g)	28. gün (g)	35. gün (g)
<b>Yerleşim Sıklığı</b>					
100 cm <sup>2</sup> /hayvan	15	62,41	107,84	147,34	172,66
200 cm <sup>2</sup> /hayvan	15	64,15	111,02	150,67	173,54
SEM		0,523	0,883	1,416	2,156
P değeri		0,027	0,018	0,110	0,777
<b>Bitkisel Ekstrekt</b>					
0 mg/kg	10	63,20	108,56	146,20	169,68
100 mg/kg	10	63,24	109,43	148,86	174,60
200 mg/kg	10	63,41	110,30	151,97	175,02
SEM		0,641	1,082	1,734	2,641
P değeri		0,971	0,532	0,083	0,300

Yerleşim sıklığı denemenin 14-21. ve 28-35. günlerinde 100 cm<sup>2</sup>/hayvan olan grupta YT değerleri sırasıyla 99,17 g; 145,83 g iken; 200 cm<sup>2</sup>/hayvan olan grupta ise sırasıyla 104,39 g; 165,90 g olarak saptandı. Çalışmada yerleşim sıklığı artıkça YT'nin azaldığı tespit edildi. Yerleşim sıklığının YT üzerine etkisi ele alındığında çalışmanın 14-21. ve 28-35. günlerinde

istatistiksel açıdan önemli ( $p < 0,01$ ) düzeyde farklılık olduğu bulundu. Araştırmanın 21-28. günlerinde ise tam tersi bir etki gösterdiği 100 cm<sup>2</sup>/hayvan olan grupta YT değeri 98,69 g iken; 200 cm<sup>2</sup>/hayvan olan grupta 86,42 g olarak ölçülüp farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı saptanmış olup, YT değerlerine ilişkin veriler Tablo 2'de verildi.

**Tablo 2.** Yerleşim sıklığı ve bitkisel ekstrekt ilavesinin Yem Tüketimi (YT) ortalamaları üzerine etkisi  
**Table 2.** The effect of stocking density and herbal extract supplementation on Feed Consumption (FC) averages

Gruplar	n	14-21. günler (g)	21-28. günler (g)	28-35. günler (g)	14- 35. Günler (g)
<b>Yerleşim Sıklığı</b>					
100 cm <sup>2</sup> /hayvan	15	99,17	98,69	145,83	343,707
200 cm <sup>2</sup> /hayvan	15	104,39	86,42	165,90	356,727
SEM		1,222	4,381	4,083	6,576
P değeri		0,006	0,059	0,002	0,174
<b>Bitkisel Ekstrekt</b>					
0 mg/kg	10	99,51	94,90	149,39	343,814
100 mg/kg	10	101,39	91,11	157,17	349,684
200 mg/kg	10	104,43	91,67	161,04	357,152
SEM		1,497	5,366	5,000	8,054
P değeri		0,084	0,866	0,264	0,512

YYO üzerine olan etkilerine baktığımızda 100 cm<sup>2</sup>/hayvan olan grupta YYO sırasıyla çalışmanın 21-28 ve 28-35. günlerinde sırasıyla 2,55 ve 3,29 iken; 200 cm<sup>2</sup>/hayvan olan grupta ise 2,19 ve 2,29 olarak saptandı. Çalışmanın 21-28. (p<0,05) ve 28-35. (p<0,01) günlerde YYO olumsuz yönde etkilendiği ve

farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlendi. Yerleşim sıklığının YYO açısından ise çalışmanın 14-21. günlerinde önemli bir etki göstermemiş olup Tablo 3'te sunuldu.

**Tablo 3.** Yerleşim sıklığı ve bitkisel ekstrakt ilavesinin Yemden Yararlanma Oranı (YYO) üzerine etkisi  
**Table 3.** The effect of stocking density and herbal extract supplementation on Feed Utilization Rate (GFR)

Gruplar	n	14-21. günler (g yem / g CAA)	21-28. günler (g yem / g CAA)	28-35. günler (g yem / g CAA)	14- 35. günler (g yem / g CAA)
<b>Yerleşim Sıklığı</b>					
100 cm <sup>2</sup> /hayvan	15	2,18	2,55	3,29	2,64
200 cm <sup>2</sup> /hayvan	15	2,23	2,19	2,29	2,30
SEM		0,028	0,109	0,202	0,073
P değeri		0,235	0,031	0,002	0,001
<b>Bitkisel Ekstrakt</b>					
0 mg/kg	10	2,19	2,53	2,97	2,35
100 mg/kg	10	2,20	2,32	2,84	2,35
200 mg/kg	10	2,23	2,27	2,57	2,42
SEM		0,034	0,134	0,247	0,089
P değeri		0,689	0,370	0,512	0,799

Araştırmanın 35. gününde kesilen bıldırcınlarda, kesimden 15 dk sonra yapılan ölçümde et pH'sının etkilenmediği ancak 24 saat sonra yapılan ölçümde önemli düzeyde (p<0,05) bir farklılık oluşturduğu saptandı. Et pH'sının 15 dk sonra yapılan ölçümünde hem yerleşim sıklığından hem de bitkisel ekstrakt ilavesinden etkilenmediği görüldü. Ancak 24 saat sonra yapılan ölçümde 100 cm<sup>2</sup>/hayvan olan grupta et pH'sı 5,8 iken; 200 cm<sup>2</sup>/hayvan olan grupta ise 5,9 olarak ölçülüp, istatistiksel olarak farkın önemli (p<0,05) olduğu tespit edildi. Et pH'sının 24 saat sonra yapılan ölçümünde bitkisel ekstraktın istatistiksel olarak önemli düzeyde (p<0,001) bir farklılık oluşturduğu saptandı. Bitkisel ekstrakt ilave edilen gruplarda (0, 100, 200 mg/kg) et pH'sı sırasıyla 6,0, 5,8 ve 5,8 olarak bulundu ve istatistiksel olarak önemlilik tespit edildi. Bitkisel ekstrakt ve yerleşim sıklığı etmenleri arasındaki etkileşimde de benzer

etkiler gözlemlendi. 15 dk sonra yapılan ölçümde et pH'sının etkilenmediği, ancak 24 saat sonra yapılan ölçümde istatistiksel olarak farkın önemli (p<0,001) olduğu saptandı. Et rengi parametreleri açısından ise yerleşim sıklığının göğüs etinde L\*, a\* ve b\* renk değerleri üzerine etkileri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı saptandı. Denemede bitkisel ekstraktın sadece göğüs etinde L\* değeri üzerine etki gösterdiği belirlenip, istatistiksel açıdan farkın önemli düzeyde (p<0,05) olduğu saptandı. Bitkisel ekstrakt 0 mg/kg olan grupta L\* değeri 6,0 iken; 100 mg/kg ve 200 mg/kg olan gruplarda 5,8 olarak belirlendi. Göğüs etinde b\* ve a\* değerleri üzerinde ise bitkisel ekstraktın etki göstermediği ortaya konuldu. Elde edilen verilerin bazılarında sağlıklı sonuç alınmadığı için istatistik dışı bırakılmıştır. Et kalitesine ilişkin parametreler Tablo 4 verildi.

**Tablo 4.** Yerleşim sıklığı ve bitkisel ekstrakt ilavesinin et pH'sı, göğüs eti rengi ve pişirme kaybı değerleri üzerine etkileri

**Table 4.** The effects of stocking density and herbal extract supplementation on meat pH, breast meat color and cooking loss values

Gruplar	n	Et pH değeri (%)		Et rengi değerleri (%)			Pişirme kaybı (%)
		15 dk	24 saat	Parlaklık (L*)	Kırmızılık (a*)	Sarılık (b*)	
<b>Yerleşim Sıklığı</b>							
100 cm <sup>2</sup> /hayvan	60	6,6	5,8a	54	9,4	12	26,10a
200 cm <sup>2</sup> /hayvan	57	6,6	5,9b	53	11	11	27,66b
SEM		0,030	0,027	0,360	0,302	0,222	2,59
P değeri		0,332	0,026	0,476	0,741	0,375	0,003
<b>Bitkisel Ekstrakt</b>							
0 mg/kg	39	6,6	6,0a	52b	9,2	11	26,81
100 mg/kg	38	6,5	5,8b	54a	9,5	12	26,63
200 mg/kg	40	6,6	5,8b	54a	9,6	12	27,21
SEM		0,037	0,033	0,435	0,364	0,268	3,61
P değeri		0,317	0,001	0,031	0,717	0,588	0,643

a, b: Aynı sütunda farklı harf ile gösterilen ortalamalar arası fark

Kan parametrelerine ilişkin veriler Tablo 5'te sunulmuş olup yerleşim sıklığının serum MDA ve kortikosteron değerleri üzerine önemli bir etki oluşturmadığı, SOD değeri üzerine etkileri ise 100 cm<sup>2</sup>/hayvan olan grupta 0,09 IU/ml iken; 200 cm<sup>2</sup>/hayvan olan grupta 0,10 IU/ml olarak belirlendi ve farkın istatistiksel olarak önemli olduğu (p<0,05)

tespit edildi. Bitkisel ekstrakt ilavesinin serum MDA, SOD, kortikosteron değerleri ve H/L oranı üzerine bir etki oluşturmadığı saptandı. Yerleşim sıklığı olan gruplarda kan H/L oranı açısından da farkın istatistiksel olarak önemli (p<0,05) olduğu belirlendi.

**Tablo 5.** Yerleşim sıklığı ve bitkisel ekstrakt ilavesinin serum MDA, SOD ve kortikosteron değerleri ve H/L oranı üzerine etkisi

**Table 5.** The effect of the frequency of stocking density and herbal extract supplementation on serum, SOD and corticosterone values and H/L ratio

Gruplar	n	MDA (nmol/ml)	SOD (IU/ml)	Kortikosteron (ng/ml)	H/L Oranı (%)
<b>Yerleşim Sıklığı</b>					
100 cm <sup>2</sup> /hayvan	30	0,57	0,09a	0,26	0,23a
200 cm <sup>2</sup> /hayvan	30	0,63	0,10b	0,29	0,24b
SEM		0,568	0,003	0,015	0,012
P değeri		0,472	0,020	0,153	0,048
<b>Bitkisel Ekstrakt</b>					
0 mg/kg	20	0,50	0,09	0,29	0,27
100 mg/kg	20	0,70	0,10	0,28	0,21
200 mg/kg	20	0,60	0,10	0,26	0,24
SEM		0,751	0,004	0,019	0,015
P değeri		0,509	0,370	0,538	0,549

a, b: Aynı sütunda farklı harf ile gösterilen ortalamalar arası fark

## TARTIŞMA

Yerleşim sıklığının fazla olması hastalık ve stres riskini de artırdığı için CA, CAA, YT ve YYO'nda gerilemeye ve et kalitesinde düşümlere neden olmaktadır. Çalışmanın bulgularına benzer olarak Mahrose ve ark. (2019) farklı yerleşim sıklığında

yetiştirilen (75 cm<sup>2</sup>/bıldırcın ve 100 cm<sup>2</sup>/bıldırcın) Japon bıldırcınlarında yerleşim sıklığının artması ile CA'nın ve YT'nin (p<0,01) azaldığını ve istatistiksel olarak önemli olduğu saptamışlardır. Seven ve ark. (2013) Japon bıldırcınlarında farklı yerleşim sıklığının

(80 cm<sup>2</sup>/bıldırcın, 160 cm<sup>2</sup>/bıldırcın) etkisinin incelendiği çalışmada CA'nın ve CAA'nın (p<0,01) olumsuz etkilendiği tespit etmişlerdir. Japon bıldırcın rasyonlarına farklı yerleşim sıklığında (100 ve 150 cm<sup>2</sup>/bıldırcın) zeytin yaprağı ekstraktı (0, 200, 400 ppm) ilavesi yapılmış ve yerleşim sıklığının artmasına bağlı olarak CA ve YT'nin azaldığı saptanmıştır. Yüksek yerleşim sıklığı ve 400 ppm zeytin yaprağı ekstraktı ilave edilen gruplarda, CAA'nın arttığı ortaya konmuştur (Bahşi ve ark. 2016). Sur Aslan ve ark. (2014) farklı yerleşim sıklığının (80, 160 cm<sup>2</sup>/bıldırcın) ilk iki hafta bıldırcınların CA ortalamasını etkilemediğini, ancak benzer olarak 3.-6. haftalar arasında yerleşim sıklığı arttıkça CA'nın azaldığını (P<0,01) saptamışlardır. Yapılan diğer bir çalışmada Japon bıldırcınlarında farklı yerleşim sıklığının (150, 200, 250, 300 cm<sup>2</sup>/ hayvan) büyüme ve karkas özellikleri üzerine etkisi araştırılmıştır. 250 cm<sup>2</sup>/hayvan olan gruplarda CA, CAA, YYO'nun daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (Daş ve ark. 2017).

Kanatlılarda yerleşim sıklığı önemli bir stres faktörüdür ve bu amaçla rasyonlara bitkisel ekstrakt ilavesi yapılmaktadır. Bitkisel ekstrakt ile yapılan çalışmalara baktığımızda ise Ölmez ve ark. (2021) Japon bıldırcınlarında (*Coturnix coturnix japonica*) yarpuzun (*Mentha pulegium* L.) performans ve et kalitesine etkisi üzerine, toplam 150 adet 1 günlük yaşta Japon bıldırcın civcivi kullanmış ve üç farklı düzeyde yarpuz içeren (%0; 0,1 ve 0,2) deneme grupları oluşturmuştur. Deneme sonunda CA ve CAA açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında farklılığın önemli olduğu, göğüs eti renk değerleri (L\*, a\* ve b\*) ile pH değerinin ise etkilenmediği saptanmıştır. Diğer bir çalışmada Reda ve ark. (2021)'de yapmış olduğu bir çalışmada bıldırcınlarda meyan kökünün (*Glycyrrhiza glabra*) performans verileri (CA, CAA, YT, YYO) üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kontrol grubu, 250, 500, 750 ve 1000 mg/kg meyan kökü şeklinde ilave edilerek toplam 5 grup oluşturulmuştur. 750 ve 1000 mg/kg meyan kökü ilave edilen gruplarda performans verilerinin en iyi olduğu saptanmıştır. Daş ve ark. (2020)'de yapmış olduğu çalışmada bıldırcın rasyonlarına nane yağı ilavesinin besi performansı, et kalitesi, karkas kompozisyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 10 günlük yaşta 40 adet Japon bıldırcını kullanılmış ve deneme 35 gün sürdürülmüştür. Araştırma grupları, her birinde 10 bıldırcın bulunan 4 gruptan oluşturulmuştur. Bıldırcınlar için hazırlanan rasyonlarda, kontrol grubunda herhangi bir katkı kullanılmazken, diğer grupların yemlerine %0,1, %0,2 ve %0,3 nane yağı ilave edilmiştir. Deneme boyunca performans parametreleri (CA, CAA, YT, YYO), karkas kompozisyonu ve et kalitesi parametrelerini (etin rengi ve pH'sı) etkilemediği ve istatistiksel olarak gruplar arasında fark olmadığı gözlenmiştir. Naimati (2019)'nın kinoa tohumu (*Chenopodium quinoa* Willd) ekstraktının bıldırcın rasyonlarına ilavesinin (0;

0,1; 0,2 ve 0,4 g/ kg) CA ve CAA'nı gruplar arasında değiştirmedeği saptanmıştır.

Bülbül ve ark. (2015) yapmış olduğu çalışmada, rasyona adaçayı ve defne ilavesi yapılmış ve çalışmanın bulgularına benzer olarak CA bakımından oluşan farkın istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı ortaya konmuştur. Çalışma bulgularına benzer sonuçların elde edildiği bir diğer çalışmada (İflazoğlu ve ark. 2015) soğuk stresi altında Japon bıldırcınlarının rasyonlarına çöven otu ekstraktı (0, 50 ve 100 ppm) eklenmiştir. Denemede performans verileri açısından istatistiksel farkın olmadığı saptanmıştır. Diğer bir çalışmada (Özcan, 2016) da Japon bıldırcınlarına farklı düzeylerde *Panax ginseng* (sarmaşıkgiller) kök ekstrakt eklenmiş ve CA parametresi üzerine bu bitki ekstraktının çalışmayla benzer şekilde etki oluşturmadığı saptanmıştır. Çalışmadanyine farklı olarak bıldırcın rasyonlarına *Macleaya cordata* ve *magnolia* ağacı ekstrakt karışımı (Filopower); ilave edilmesinin (0, 100, 150 ve 200 g/ton) etkilerinin incelendiği çalışmada, 100 g/ton düzeyinde ilavenin 0-7., 14-21. ve 21-28. günlerde daha yüksek CAA sağladığı tespit edilmiştir (Çetin ve ark. 2019). Bıldırcın rasyonlarına biberiye uçucu yağı (0, 200, 250 mg/kg) ilave edilerek yapılan çalışmada YT ve YYO gibi performans verilerini etkilemediği saptanmıştır (Çetin ve ark. 2017). Kocaoğlu ve ark. (2010)'nin yapmış olduğu çalışmada da, bıldırcın rasyonlarına farklı düzeylerde (%0,5; 1; 2 ve 4) sarımsak tozu ilavesi yapıldığında, YYO bakımından farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur. Aynı şekilde Kaya ve Turgut (2012) bıldırcınlarda adaçayı, kekik ve nane ekstraktları ile yaptığı çalışmada YYO üzerine önemli bir etki oluşturmadığı saptanmışlardır.

Diğer parametreler açısından değerlendirdiğimizde Jobe ve ark (2019)'nın etlik piliçlerde yaptığı çalışmada rasyona bitkisel ekstrakt karışımı (dut yaprağı, japon hanımeli, goldthread içeren tıbbi bitkiler) ilavesinin kesim sonrasında ve kesimden 72 saat sonraki pH ölçümlerinde istatistiksel açıdan önemli fark (p<0,05) olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmanın bulgularından farklı olarak bıldırcın rasyonlarına kekik uçucu yağı ilavesinin (0, 150, 300) kesim sonrası 0., 3., 6., ve 9. günlerde yapılan ölçümlerde pH ve göğüs eti renk değerlerinde istatistiksel olarak bir farklılık olmadığı saptanmıştır (Gümüş ve ark. 2017). Biricik ve ark. (2012) bıldırcınların rasyonlarına mersin yağı ilave edilmesinin pH değerinde farklılık oluşturmadığını saptamışlardır. Yapılan çalışma bulguları ile benzer olarak Önel ve Aksu (2019) yaptığı çalışmada farklı yerleşim sıklığında (90 ve 160 cm<sup>2</sup> /bıldırcın), farklı düzeylerde zahter uçucu yağıyla (0, 200, 400 ve 600 mg/kg) ile beslenen Japon bıldırcınlarında et rengi değerlerinin (L\*, a\* ve b\*) yerleşim sıklığından etkilenmediği ve istatistiksel olarak farkın önemli olmadığını tespit etmiştir. Aksu ve ark. (2014) yapmış olduğu çalışmada bıldırcın rasyonlarına bitkisel ekstrakt ve esans yağları (kekik, nane ve anason)

ilavesinin 24. ve 96. saatlerde göğüs et renk değerleri L\*, a\* ve b\* üzerine önemli etkisi olmadığını saptamışlardır. Yapılan çalışma bulgularından farklı olarak Tugiyenti ve ark. (2019) yapmış olduğu çalışmada farklı düzeyde avakoda tohumu tozunun (%3, 6, 9) dişi bildircinlerde et kalitesi üzerine etkilerini incelemişler ve pişirme kaybının azaldığını bunun istatistiksel olarak önemli (P<0,05) olduğunu tespit etmişlerdir.

Kanda yapılan parametreler açısından değerlendirdiğimiz de ise Önel ve Aksu (2019) yaptığı çalışmada Japon bildircinlerinde farklı yerleşim sıklığında (90 ve 160 cm<sup>2</sup>/bildircin) rasyonlara farklı düzeylerde zahter uçucu yağı (0, 200, 400 ve 600 mg/kg) ilave etmişler ve serum MDA değerinin kontrol grubunda en düşük bulmuşlar ve istatistiksel olarak farkın önemli (p<0,01) olduğu saptamışlardır. Diğer bir çalışmada (Sur Aslan ve ark. 2014) bildircinlerde farklı yerleşim sıklığında (80 ve 160 cm<sup>2</sup>/bildircin) rasyonlarına farklı düzeylerde propolis (0,5; 1 ve 1,5 g/kg) eklemişler ve serum MDA değeri yerleşim sıklığı olan grupta en yüksek (p<0,01) olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer olarak Tatlı Seven ve ark. (2015) yapmış oldukları çalışmada farklı yerleşim sıklığında (80 ve 160 cm<sup>2</sup>/bildircin) rasyona arı poleni ilavesinin Japon bildircinlerinde serum MDA değerinin yerleşim sıklığı olan grupta en yüksek (p<0,01) olduğunu saptamışlardır. Bildircin rasyonlarına biberiye uçucu yağı ilave (0, 200 ve 250 mg/kg) edildiğinde plazma MDA düzeyinde önemli düzeyde (p<0,01) farklılık oluşturduğu, ancak SOD değerinin ise etkilenmediği ortaya konulmuştur (Çetin ve ark. 2017). Yapılan çalışma bulgularından farklı olarak Aksu ve ark. (2014) bildircinlerde göğüs etinde kesimden 24 saat sonra yapılan ölçümde MDA değerinin bitkisel ekstrakt eklenen grupta düşük (P<0,05) olduğunu saptamışlardır. Diğer bir çalışmada (Konca ve ark. 2015) ise bildircin rasyonlarına farklı düzeylerde semizotu tohumu ilavesi yapılmış ve kanda MDA ve SOD değerlerinin semizotu tohumu miktarı arttıkça arttığını farkın istatistiksel açıdan önemli (P<0,01) olduğunu tespit etmişlerdir.

## SONUÇ

Sonuç olarak, yerleşim sıklığının düşük olmasının performans verileri üzerine olumsuz yönde etki oluşturduğu, ancak özellikle performans üzerine oluşan bu olumsuz etkinin giderilmesinde bitkisel ekstrakt katkısının yapılmasının herhangi bir olumlu etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır. Bunun sebebi kullanılan bitkisel ekstraktın elde edildiği bitkilerin ve bitki kısımlarının uygun olmaması, uygun yöntemlerle elde edilmemesi ve rasyona ilave edilen düzeyin yetersizliğinden dolayı olabileceği düşünülebilir. Ayrıca çalışmada kullanılan etlik bildircin hattının genetik olarak stres faktörlerine dirençli olmasından dolayı yüksek yerleşim sıklığı oluşturulan bölmelerde strese adaptasyon şekillenmiş ve bir direnç oluşmuş

olabilir. Bu sebepten yerleşim sıklığının tam oluşturulamamasına bağlı bitkisel ekstrakt katkısının da tam olarak etkisi gözlenmemiş olabilir.

Bildircin yetiştiriciliğinde birim alandan daha fazla yararlanmak amaçlı yapılan yetiştiricilik anlayışı, yaygın olarak yerleşim sıklığına bağlı hem fiziksel hem de fizyolojik olarak stresin oluşmasına neden olmaktadır. Bu anlamda gelişen strese bağlı verim performansındaki ve verim kalitesindeki düşüşün önlenmesinde beslenme önemli bir konudur. Bildircin yetiştiriciliğinde yerleşim sıklığının oluşturduğu stresin olumsuz etkilenin azaltılmasında farklı bitkisel ekstrakt katkılarının gerek performans, gerekse ürün kalitesi üzerine etkilerinin irdelenmesi ve olası olumlu etkiler elde edilmesi durumunda saha şartlarında bu ürünlerin kullanımının etlik bildircin üretimi yapan işletmelere yol göstermesi açısından yardımcı olacaktır.

**Çıkar çatışması:** Bu çalışmada çıkar çatışması bulunmamaktadır.

**Etik İzin:** Bu çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26.02.2019 tarih ve 2019/023 sayılı onayı ile gerçekleştirildi.

**Finansal Destek:** Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

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

**Açıklama:** Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı "Farklı Yerleşim Sıklığında Yetiştirilen Bildircinlerin Rasyonlarına Bitkisel Ekstrakt Karışımı Katılmasının Performans, Et Kalitesi ve Bazı Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkisi" başlığı ile tamamlanan Doktora Tezinin bir bölümünden özetlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Adıyaman E, Ayhan V.** Etlik piliçlerin beslenmesinde aromatik bitkilerin kullanımı. Hayvansal Üretim, 2010; 51(1): 57-63.
- Aksu Elmalı D, Yakan A, Kaya O, Elmalı M, Onk K, Şahin T, Durna Ö.** Effects of plant extracts and (essential) oil mixture on breast meat quality of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). Revue de Médecine Vétérinaire, 2014; 165(3-4): 104-110
- Arslan A.** Yoğun yerleşim sıklığında beslenen bildircinlerde farklı propolis düzeylerinin performans karkas yağ asitleri ve bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkisi. 2012; Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

- Bahşi M, Çiftçi M, Şimşek ÜG, Azman MA, Özdemir G, Yılmaz Ö, Dalkılıç B.** Effects of olive leaf extract (oleuropein) on performance, fatty acid levels of breast muscle and some blood parameters in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) reared in different stocking densities. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2016; 63(1):61-68, doi: org/10.1501/Vetfak\_0000002710.
- Basmacıoğlu H, Tokuşoğlu O, Ergül M.** The effect of oregano and rosemary essential oils or alpha-tocopheryl acetate on performance and lipid oxidation of meat enriched with n-3 PUFA's in broilers. *South African Journal of Animal Science*, 2004; 34 (1): 197-210, doi: org/10.29185/hayuretım.362159.
- Biricik H, Yesilbağ D, Gezen SS, Bülbül T.** Effects of dietary myrtle oil (*Myrtus communis* L.) supplementation on growth performance, meat oxidative stability, meat quality and erythrocyte parameters in quails. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 2012; 163 (3): 131-138.
- Bülbül T, Özdemir V, Bülbül A.** Use of sage (*Salvia triloba* L.) and laurel (*Laurus nobilis* L.) oils in quail diets. *Eurasian Journal of Veterinary Science*, 2015; 31(2): 95-101.
- Çetin M.** Hayvan beslemede antibiyotik ve antiparazitlere alternatif olarak bitkisel ekstraktlar ve pelinotu'nun (*Artemisia absinthium*) kullanılması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 2012; 15(4): 58-63.
- Çetin I, Yeşilbağ D, Cengiz ŞŞ, Belenli D.** Effects of supplementation with rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) volatile oil on growth performance, meat MDA level and selected plasma antioxidant parameters in quail diets. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2017; 23(2): 283-288, doi: 10.9775/kvfd.2016.16438.
- Çetin I, Yeşilbağ D, Cengiz ŞŞ, Belenli D.** Etlik bildircin rasyonlarına ilave edilen yeni nesil bitkisel ekstrakt karışımının performans, sekal mikroflora ve bazı kan parametreleri üzerine etkisi, 2019; Bilimsel Araştırma Sonuç Raporu (Projr no: NKUBAP. 10. GA.18.145). Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
- Daş D, Mohanty GP, Pradhan CR, Behera K.** Effect of stocking density on growth and carcass characteristics of Japanese quail. *The Indian Society of Animal Production and Management*, 2017.
- Daş B, Daş A, Koyuncu İ, Bilal O, Çetin M, Kırar N, Tufan T, Şengül A.Y.** Bildircin rasyonlarına nane yağı ilavesinin besi performansı, et kalitesi, karkas kompozisyonu ve oksidatif stres belirleyicileri üzerine etkisi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 2020; 7(1): 186-194. doi: org/10.30910/turkjans.680061
- Gross WB, Siegel HS.** Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases*, 1983; 27(4): 972-979.
- Gümüş R, Gelen SU, Ceylan ZG, İmik H.** Bildircin rasyonuna katılan kekik uçucu yağının göğüs etinin bazı mikrobiyolojik ve fizikokimyasal özelliklerine etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 2017; 31(3): 153-158.
- Honikel KO.** Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 1998; 49(4): 447-457, doi: org/10.1016/S0309-1740(98)00034-5.
- İflazoğlu Mutlu S, Çelik Ö, Bayrak O, Emreoğlu L, Terlemez F, Azman MA, Şişek ÜG, Özçelik M, Çerçi İH, Kenar M, Çiftçi M.** Soğuk stres koşulları altında bildircin karma yemlerine ilave edilen saponin bakımından zenginleştirilmiş çöven ekstraktının performans ve kan parametreleri üzerine etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 2015; 29 (2): 103-109. doi: org/10.33988/auvfd.717013.
- İnci H, Şengül AY, Daş A, Karakaya E, Kayaokay A.** Kafes ve yer sisteminde yetiştirilen bildircinların besi performansı ve karkas özellikleri bakımından karşılaştırılması. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 2015; 2(1): 119-125.
- Jobe MC, Ncobela NC, Kunene NW, Opuku AR.** Effects of Cassia abbreviata extract and stocking density on growth performance, oxidative stress and liver function of indigenous chickens. *Tropical Animal Health and Production*, 2019; 51:2567-2574, doi: 10.1007/s11250-019-01979-y.
- Kahraman Z.** Bitkisel yem katkı maddelerinin yumurta tavuğu yemlerinde kullanımı. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi*, 2009; 8(1): 34-41.
- Karasu K, Öztürk E.** Tıbbi aromatik bitkilerin kanatlılarda antioksidan ve antimikrobiyal etkileri. *Turkish Journal Agricultural and Natural Science*, 2014; 1(2): 1776-1772.
- Kaya A, Turgut L.** Yumurtacı tavuk rasyonlarına değişik oranlarda katılan adaçayı (*Salvia officinalis*), kekik (*Thymbra spicata*), nane (*Menthae piperitae*) ekstraktları ile vitamin E' nin performans, yumurta kalitesi ve yumurta sarısı üzerine etkileri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2012; 43 (1): 49-58.
- Kılıç HM.** Bildircinlarda büyütme dönemi sınırlı yemleme uygulamasının yumurtlama dönemi verim özelliklerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, 2005, Adana.
- Kocaoğlu B., Eren M, Uyanık F, Kara K.** Japon bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) yemlerine ilave edilen sarımsak tozunun performans, yumurta kalitesi, bazı biyokimyasal parametreler ve yumurta sarısı kolesterolüne etkisi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2010; 7(2): 89-97.
- Konca Y, Büyükkılıç Beyzi S, Karabacak M, Yaylak E.** Bildircin rasyonlarına farklı seviyelerde semizotu tohumu (*Portulaca oleracea* L.) ilavesinin karkas, kan lipid profili ve antioksidan özellikler üzerine etkisi. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi*, 2015; 12(2): 1-6.
- Lange L.** Nutribiotics could replace antibiotics in feed. *World's Poultry Science Journal*, 2005; 21(10): 26-28, doi: org/10.4081/ijas.2007.1s.731.
- Mahrose KM, Alagawany M, Elhack M, Mahgoub AM, Atta AM.** Influences of stocking density and probiotic supplementantion on growing Japanese quail performance. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 2019; 91(1): 1-10, doi: 10.1590/0001-3765201920180616.
- Mlynek K, Charuta A, Janiuk I, Głowińska B.** Effect of dressing percentage on chemical composition, microstructure and quality traits of pectoralis major muscle in female Japonesse quail. *European Poultry Science*, 2016; 80: 1-9, doi: 10.1399/eps.2016.119.
- Naimati S.** Kiano Tohumu (*Chenopodium quinoa* Willd.) Ekstratının japon bildircinlarında performans, karkas özellikleri ve et kalitesi üzerine etkileri. 2019; Yüksek Lisans Tezi, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Niğde.
- Nazlıgül A, Bardakçioğlu HB, Türkyılmaz K, Cenani N, Oral D.** Japon bildircinlarında (*Coturnix coturnix japonica*) yerleşim sıklığının yumurta verimi, yumurta ağırlığı ve yem tüketimine etkisi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi*, 2001; 27(2): 429-438.
- NRC.** Nutrient Requirements of Poultry: 9th revised edition, National Academy Press, Washington, DC. 1994; 176.
- Ölmez M, Adıgüzel Işık S, Şahin T, Yörük MA.** The effects of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) on performance, carcass and meat quality in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2021; 68(3): 343-348. doi: 10.33988/auvfd.767472

- Önel SE, Aksu T.** The effect of thyme (*Thymbra spicata* L. var. *spicata*) essential oil on the antioxidant potential and meat quality of japanose quail feed and various stocking densities. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2019;14(2):129-136, doi: 10.17094/ataunivbd.486782.
- Özcan MA.** Japon bıldırcınlarının rasyonlarına panax ginseng kök ekstrakt ilavesinin yumurta verimi ve bazı kan parametreleri üzerine etkileri. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2016; 6(2): 68-74.
- Özdamar K.** Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi 1. 1999, Eskişehir: Kaan Kitapevi.
- Reda FM, El-Saadony MT, El-Rayes TK, Farahat M, Attia G, Alagawany M.** Dietary effect of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) on quail performance, carcass. blood metabolites and intestinal microbiota, *Poultry Science*, 2021; 100 (8):1-8. doi: 10.1016/j.psj.2021.101266
- Seven İ, Seven PT, Sur Arslan A, Şimşek ÜG, Gökçe Z.** Farklı yerleşim sıklığında yetiştirilen japon bıldırcınlarının (*Coturnix coturnix japonica*) performans parametreleri üzerine rasyona katılan multienzimin etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 2013; 27 (3): 155-158.
- Sur Arslan A, Tatlı Seven P, Yılmaz S, Seven I.** The effects of propolis on performance, carcass and antioxidant status characteristics in quails reared under different stocking density. *European Poultry Science*, 2014; 78, doi.org/10.1080/09712119.2016.1206901.
- Tatlı Seven P, Sur Arslan A, Seven İ, Gökçe Z.** The effects of dietary bee pollen on lipid peroxidation and fatty acids composition of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) meat under different stocking densities. *Journal of Applied Animal Research.*, 2015; 44:1, 487-491. doi: 10.1080/09712119.2015.1091339
- Tipu MA, Akhtar MS, Anjum MI, Raja ML.** New dimension of medicinal plants as animal feed. *Pakistan Veterinary Journal*, 2006; 26(3): 144-148.
- Tugiyenti E, Iriyanti N, Apriyanto S.** The effect of avocado seed powder (*Persea americana* Mill.) on the liver and kidney functions and meat quality of culled female quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Veterinary World*, 2019; 12(10): 1608-1615. doi: 10.14202/vetworld.2019.1608-1615
- Wheeler CR, Salzman NM, Elsayed ST, Korte JR.** Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry*, 1990; 184(2): 193–199, doi: 10.1016/0003-2697(90)90668-y.
- Windisch W, Schedle K, Pätzner C, Kroismayr A.** Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal Animal Science*, 2008; 86:140–148. doi:10.2527/jas.2007-0459
- Yadgari L, Kinreich R, Druyan SÇ, Cahaner A.** The effects stocking density in hot conditions on growth, meat yield and meat quality of featherless and feathered broilers. XII European Conference, Verona, İtaly, *World Poultry Science Journal*, 2006; 62, 603.
- Yoshioka T, Kawada K, Shimada T and Mori M.** Lipid Peroxidation in Maternal Cord Blood and Protective Mechanism against Activated Oxygen Toxicity in Blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1979; 135: 372-376.
- Yurdakul F.** Bıldırcınlarda bireysel ve grup düzeyinde erkek katımında erkek/dişi oranlarının dölülüğe etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, 2006; Adana.

## Evaluating the Awareness Level of Zoonotic Diseases Among Final-Year Veterinary Students

Berna YANMAZ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, Turkey

### ABSTRACT

Zoonotic diseases have significant implications for public health, and veterinary professionals are essential in their prevention and control. This study aimed to evaluate the level of zoonotic disease awareness among final-year veterinary students and explore their perspectives on protection against these diseases. A survey was administered to 128 final-year veterinary students, and the data were analyzed to investigate the associations between demographic factors and cumulative scores, which were based on six statements related to zoonosis awareness. The results showed a moderate level of awareness among the participants. No significant differences in cumulative scores were observed with respect to age ( $P = 0.769$ ), gender ( $P = 0.342$ ), geographical region of residence ( $P = 0.565$ ), living area ( $P = 0.748$ ), and grade point average ( $P = 0.468$ ). However, students who owned or took care of companion animals (4 [1-6]) exhibited higher cumulative scores compared to those who did not own companion animals (3 [1-6];  $P = 0.011$ ). Further research is needed to explore the underlying factors and develop educational interventions that promote zoonotic disease awareness among veterinary students.

**Key Words:** animal, education, questionnaire, survey, zoonosis

\*\*\*

### Veteriner Fakültesi Son Sınıf Öğrencilerinin Zoonoz Hastalıklar Konusundaki Farkındalık Düzeylerinin Değerlendirilmesi

#### ÖZ

Zoonotik hastalıkların halk sağlığı üzerinde önemli etkileri vardır ve veteriner hekimler bu hastalıkların önlenmesi ve kontrolünde çok önemli rol üstlenmişlerdir. Bu çalışma, son sınıf veteriner fakültesi öğrencilerinin zoonoz hastalıklar konusundaki farkındalık düzeylerini değerlendirmek ve bu hastalıklardan korunma konusundaki bakış açılarını araştırmak amacıyla yapılmıştır. 128 son sınıf veteriner fakültesi öğrencisine bir anket uygulandı ve zoonoz farkındalığıyla ilgili altı ifadeye dayanan demografik faktörler ile kümülatif puanlar arasındaki ilişkileri araştırmak için veriler analiz edildi. Sonuçlar, katılımcılar arasında orta düzeyde bir farkındalık olduğunu gösterdi. Yaş ( $P = 0.769$ ), cinsiyet ( $P = 0.342$ ), yaşanan coğrafi bölge ( $P = 0.565$ ), yaşanan bölge ( $P = 0.748$ ) ve not ortalamasına göre kümülatif puanlarda anlamlı bir fark gözlenmedi ( $P = 0.468$ ). Ancak, evcil hayvanlara sahip olan veya onlara bakan öğrenciler (4 [1-6]), evcil hayvanlara sahip olmayanlara kıyasla (3 [1-6];  $P = 0.011$ ) daha yüksek kümülatif puanlar sergiledi. Altta yatan faktörleri araştırmak ve veteriner fakültesi öğrencileri arasında zoonotik hastalık farkındalığını teşvik eden eğitimsel faaliyetleri geliştirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Anket, eğitim, hayvan, survey, zoonoz

To cite this article: Yanmaz B. Evaluating the Awareness Level of Zoonotic Diseases Among Final-Year Veterinary Students. Kocatepe Vet J. (2023) 16(4):491-495.

Submission: 11.08.2023 Accepted: 13.11.2023 Published Online: 30.11.2023

ORCID ID; BY: 0000-0002-4176-9487

\*Corresponding author e-mail: [byanmaz@mehmetakif.edu.tr](mailto:byanmaz@mehmetakif.edu.tr)



## INTRODUCTION

Zoonotic diseases, which are infectious diseases that can be transmitted between animals and humans, have significant implications for global public health (Rahman et al. 2020; Kheirallah et al. 2021). Zoonotic diseases have gained increasing attention in recent years due to their potential to cause outbreaks, pandemics, and significant morbidity and mortality in both animals and humans (Baker et al. 2022). Veterinary professionals play a crucial role in the prevention, diagnosis, and control of these diseases, making it imperative to assess their level of awareness and knowledge (Pappaioanou 2004; Lorusso et al. 2020).

The undergraduate veterinary education program in Türkiye typically spans five years. The veterinary curriculum in Türkiye covers a wide range of subjects including basic sciences (such as anatomy, physiology, and biochemistry), preclinical science (such as microbiology, virology, and pathology) food hygiene and technology (such as dairy hygiene and technology, and public health), clinical sciences (such as medicine, and surgery), and animal husbandry and animal nutrition (such as animal feeding and genetics). The practical training and clinical rotations commence in the sixth semester and reach their culmination in the final semester with an internship, during which students primarily undergo practical education within clinics, farms, and research facilities (Ozen and Ozen 2006). Evaluating the knowledge and preparedness of veterinary students before graduation may provide a comprehensive understanding of their educational needs and potential gaps in training (Sander and Miller 2021; Routh et al. 2022).

Considering the findings of Kutlu et al. (2014), which identify direct contact with excretions from infected animals and inhalation of airborne droplets as primary modes of transmission for zoonotic diseases, veterinary students face an increased risk of

contracting these diseases due to their regular exposure to infected animals during their education. Therefore, the primary objective of this study was to assess the level of awareness among final-year students concerning zoonotic diseases, as well as to examine students' perspectives on protection from such diseases.

## MATERIAL and METHODS

This study received approval from the Ethical Committee for Social Science at Burdur Mehmet Akif Ersoy University (2023/380). A voluntary survey was conducted among final-year students enrolled in the Faculty of Veterinary Medicine Burdur Mehmet Akif Ersoy University.

The questionnaire underwent a pre-testing phase among a group of twenty selected veterinary students from the previous year, and necessary adjustments were made accordingly. The resulting sample consisted of 128 final-year students who had completed and undertaken all the theoretical courses. The questionnaire spanned one side of A4 paper, and participants were required to respond to the questions by circling one of the available answer options.

The questionnaire comprised three parts, consisting of a total of 12 questions. The first section covered student demographics, including gender, age, geographical region of residence, urban or rural living area, ownership or caretaking of companion animals, and grade point average. The second section evaluated students' comprehension of the definition of zoonotic disease through a single statement. Additionally, students' viewpoints on protection from zoonotic diseases were assessed using five statements through three-point Likert scale questions (Table 1). Each correct response related to questions was given a score of one point, and the cumulative score was calculated out of a total of 6 points.

**Table 1.** Questionnaire on the definition of zoonotic diseases and awareness of prevention among final year veterinary students

Gender	Male		Female	
Age	16-20	21-25	25-30	30>
Geographical region of residence	Mediterranean Region Aegean Region	Black Sea Region Southeastern Anatolia Region	Eastern Anatolia Region Central Anatolia Region	Marmara Region
Living area	Rural		Urban	
Ownership or caretaking of companion animal	Yes		No	
Grade point average	AA (90–00) CC (70–74)	BA (85–89) DC (65–69)	BB (80–84) DD (60–64)	CB (75–79) FD (01–59)
Which sentence provides the most accurate understanding of the definition of zoonotic diseases?	Zoonotic diseases have only the potential to be transmitted from animals to humans	Zoonotic diseases have only the potential to be transmitted from humans to animals	Zoonotic diseases can be transmitted both from humans to animals and from animals to humans	
Prior to making contact with the animal	Washing hands with water and soap or disinfectants	Washing hands with water	No washing	
After coming into contact with the animal	Washing hands with water and soap or disinfectants	Washing hands with water	No washing	
Using examination gloves before making contact with the animal	Yes	Sometimes	No	
Wearing a mask before approaching animals	Yes	Sometimes	No	
Wearing an apron or upper and lower suit before handling animals that come to the clinic	Yes	Sometimes	No	

### Statistical Analysis

The data were analyzed using MedCalc (Version 13.2.2; MedCalc, Ostend, Belgium). The normal distribution of the data was assessed using the Shapiro-Wilk test. The cumulative scores of students based on gender, living area, and ownership or caretaking of companion animals were compared using the Mann-Whitney U test. The cumulative scores of students based on age, geographical region of residence, and grade point average were compared using the Kruskal-Wallis test. Data were expressed as median (range). Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

### RESULTS

A total of 71 students (60.2%) were male, while 47 students (39.8%) were female. The majority of these students ( $n=110$ ; 93.2%) fell into the 21-25 age range. In terms of geographical distribution, the Mediterranean region had the highest number of

students (44 students, 37.3%), followed by the Aegean region with 34 students (28.8%). Out of the total, 29 students (24.6%) resided in rural areas, while 89 students (75.4%) lived in urban areas. Among the students, 69 (58.5%) owned or took care of a companion animal, while 49 (41.5%) did not have any companion animals. The most common grade point average among the students was BB ( $n=37$ , 31.4%), followed by CB ( $n=31$ , 26.3%) (Table 2).

No significant differences in cumulative scores were observed with respect to age ( $P = 0.769$ ), geographical region of residence ( $P = 0.565$ ), and grade point average ( $P = 0.468$ ). Similarly, no significant differences in cumulative scores were found based on gender ( $P = 0.342$ ) and living area ( $P = 0.748$ ). However, students who owned or took care of companion animals (4 [1-6]) exhibited higher cumulative scores compared to those who did not own companion animals (3 [1-6];  $P = 0.011$ ) (Table 2).

**Table 2.** Demographic distribution of 128 final year veterinary students responding to the questionnaire on zoonotic disease awareness and prevention.

	n (%)	Cumulative score Median (Min-Max)	<i>P</i>
<b>Gender</b>			
Female	47 (39.8%)	4 (1-6)	0.342
Male	71 (60.2%)	4 (1-6)	
<b>Age</b>			
16-20	1 (0.8%)	3 (3-3)	0.769
21-25	110 (93.2%)	4 (1-6)	
26-30	6 (5.1%)	3.5 (3-6)	
30>	1 (0.8%)	3 (1-3)	
<b>Geographical region of residence</b>			
Mediterranean Region	44 (37.3%)	4 (1-6)	0.565
Black Sea Region	8 (6.8%)	3 (2-6)	
Eastern Anatolia Region	2 (1.7%)	3 (3-3)	
Marmara Region	13 (11%)	4 (3-5)	
Aegean Region	34 (28.8%)	4 (1-6)	
Southeastern Anatolia Region	2 (1.7%)	4.5 (3-6)	
Central Anatolia Region	15 (12.7%)	4 (1-6)	
<b>Living area</b>			
Rural	29 (24.6%)	4 (1-6)	0.748
Urban	89 (75.4%)	4 (1-6)	
<b>Ownership of companion animal</b>			
Yes	69 (58.5%)	4 (1-6)	0.011
No	49 (41.5%)	3 (1-6)	
<b>Grade point average</b>			
AA (90–00)	9 (7.6%)	3 (1-6)	0.468
BA (85–89)	16 (13.6%)	3.5 (1-6)	
BB (80–84)	37 (31.4%)	4 (2-6)	
CB (75–79)	31 (26.3%)	4 (1-5)	
CC (70–74)	12 (10.2%)	4 (1-6)	
DC (65–69)	9 (7.6%)	4 (3-6)	
DD (60–64)	4 (3.4%)	3.5 (2-5)	

n: Number of students

## DISCUSSION

This study offered valuable insights into zoonotic disease awareness among final year veterinary students, representing one of the pioneering studies conducted in Türkiye on this topic. The findings revealed a moderate level of awareness among participants, contributing to the existing literature and providing an understanding of the current state of zoonotic disease knowledge among veterinary students in Türkiye.

Regarding the relationship between the demographic factors and cumulative scores, our analysis revealed no significant differences based on age, gender, geographical region, grade point average, or living area. These findings suggest that these variables may not directly influence the overall knowledge and understanding of zoonotic diseases among veterinary students in our sample. However, it is worth noting that students who owned or took care of companion animals had significantly higher cumulative scores compared to those who did not have pets. This finding indicates a potential positive association between pet ownership and enhanced awareness of zoonotic diseases. Additionally, companion animal ownership may positively influence academic

performance by contributing to reduced stress levels, increased emotional well-being, and improved focus, leading to enhanced academic performance (Pendry et al. 2023). Pets are known to provide comfort, companionship, and stress relief, which can positively impact students' overall well-being and potentially translate into improved academic outcomes (Grajfoner et al. 2017).

While this survey on zoonotic diseases awareness and prevention among students provides valuable insights, there are certain limitations that should be considered when interpreting the results. The survey relies on self-reported data provided by the students, which may be subject to recall bias or social desirability bias. Participants may have provided responses that they perceived as socially acceptable or may not accurately recall their behaviors or knowledge related to zoonotic diseases and prevention. The questionnaire utilized multiple-choice questions and predefined answer options. While this allows for standardized data collection, it limits the participants' ability to provide nuanced responses or express their level of understanding in more detail. This may result in oversimplification of

certain aspects of zoonotic diseases awareness and prevention. The survey did not include follow-up questions to explore participants' reasoning behind their responses or to gain further insights into their knowledge or practices. This restricts the depth of understanding regarding the factors influencing awareness and behaviors related to zoonotic diseases among the student population.

## CONCLUSION

In conclusion, this study suggests a potential association between pet ownership and enhanced awareness of zoonotic disease protection among veterinary students. The higher cumulative scores among students who owned or cared for companion animals may indicate a greater understanding of zoonotic diseases and their prevention measures. Further research is needed to explore the underlying factors contributing to this relationship and to develop educational interventions that promote zoonotic disease awareness among all veterinary students, regardless of pet ownership status.

**Authors' Contributions:** Idea, concept, design, data collection and analysis, and drafting of the manuscript: BY

**Ethical approval:** This study received approval from the Ethical Committee for Social Science at Burdur Mehmet Akif Ersoy University (2023/380).

**Acknowledgement:** Not applicable

## REFERENCES

- Baker, R. E., Mahmud, A. S., Miller, I. F., Rajeev, M., Rasambainarivo, F., Rice, B. L., Takahashi, S., Tatem, A. J., Wagner, C. E., Wang, L. F., Wesolowski, A. & Metcalf, C. J. E. (2022). Infectious disease in an era of global change. *Nature Reviews Microbiology*, 20(4), 193-205. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00639-z>
- Grajfoner, D., Harte, E., Potter, L. M., & McGuigan, N. (2017). The effect of dog-assisted intervention on student well-being, mood, and anxiety. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(5), 483. <https://doi.org/10.3390/ijerph14050483>
- Kheirallah, K. A., Al-Mistarehi, A. H., Alsawalha, L., Hijazeen, Z., Mahrous, H., Sheikali, S., Ramini, S. A., Maayeh, M., Dodeen, R., Farajeh, M., Masadeh, N., Alemam, A., Alsulaiman, J. & Samhoury, D. (2021). Prioritizing zoonotic diseases utilizing the One Health approach: Jordan's experience. *One Health*, 13, 100262. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100262>
- Kutlu, M., Ergonul, O., Sayin-Kutlu, S., Guven, T., Ustun, C., Alp-Cavus, S., Barcin Ozturk, S., Acicbe, O., Akalin, S., Tekin, R., Tekin-Koruk, S., Demiroglu, Y. Z., Keskiner, R., Gönen, I., Sapmaz-Karabag, S., Bosnak, V. & Kazak, E. (2014). Risk factors for occupational brucellosis among veterinary personnel in Turkey. *Preventive Veterinary Medicine*, 117(1), 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.07.010>
- Lorusso, A., Calistri, P., Mercante, M. T., Monaco, F., Portanti, O., Marcacci, M., Cammà, C., Rinaldi, A., Mangone, I., Di Pasquale, A., Iommarini, M., Mattucci, M., Fazii, P., Tarquini, P., Mariani, R., Grimaldi, A., Morelli, D., Migliorati, G., Savini, G., Borrello, S. & D'Alterio, N. (2020). A "One-Health" approach for diagnosis and molecular characterization of SARS-CoV-2 in Italy. *One Health*, 10, 100135. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100135>
- Ozen, R., & Ozen, A. (2006). Veterinary education in Turkey. *Journal of Veterinary Medical Education*, 33(2), 187-196. <https://doi.org/10.3138/jvme.33.2.187>
- Pappaioanou, M. (2004). Veterinary medicine protecting and promoting the public's health and well-being. *Preventive Veterinary Medicine*, 62(3), 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2003.11.001>
- Pendry, P., Milatz, A. L., Carr, A. M., & Vandagriff, J. L. (2023). Animal-Assisted Interventions for Improving the Mental Health and Academic Performance of University Students. *The Role of Companion Animals in the Treatment of Mental Disorders*, 221.
- Rahman, M. T., Sobur, M. A., Islam, M. S., Ievy, S., Hossain, M. J., El Zowalaty, M. E., Rahman, A. M. M. T., & Ashour, H. M. (2020). Zoonotic diseases: etiology, impact, and control. *Microorganisms*, 8(9), 1405. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091405>
- Routh, J., Paramasivam, S. J., Cockcroft, P., Nadarajah, V. D., & Jeevaratnam, K. (2022). Using learning theories to develop a veterinary student preparedness toolkit for workplace clinical training. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 833034.
- Sander, W. E., & Miller, G. Y. (2021). Public practice opportunities for veterinary students to enhance veterinary public health education. *Journal of Veterinary Medical Education*, 48(4), 376-382. <https://doi.org/10.3138/jvme.2019-0076>

## Effects of *Artemisia dracunculus* L. and *Origanum majorana* L. Extracts Added in Different Concentrations on Some Possible Foodborne Pathogenic Bacteria in Hamburger Patties

Gökhan AKARCA<sup>1\*</sup>, Nurşah CERAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Afyon Kocatepe University, Afyonkarabisar, Türkiye

### ABSTRACT

In this study, the antibacterial effects of distinct concentrations of *Origanum majorana* L. and *Artemisia dracunculus* L. extracts added to the formulation of hamburger patties on four different foodborne pathogenic microorganism named Gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) and Gram negative (*Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*), which are the most ones isolated from hamburger patties, were researched. Besides, the use of natural preservatives in conjunction with the additional extracts was also explored to see if the microbiological reliability of hamburger patties could be guaranteed. According to the findings of the research, *Origanum majorana* L. and *Artemisia dracunculus* L. extracts were found to have strong antibacterial effects on Gr (+) and Gr (-) pathogenic bacteria inoculated into hamburger patties, and it was discovered that they inhibited at various rates. The antibacterial impact found by the study turned out to be greater on Gr (+) bacteria as compared to Gr (-) bacteria. It was also verified that 2% *Artemisia dracunculus* L. extract provided the highest antibacterial effect on *Listeria monocytogenes* with a decrease of 3.38 log cfu/g. Furthermore, it became apparent that the antibacterial impact grew in direct proportion to the concentration applied to the extracts employed, and that the antibacterial effect generated by the *Artemisia dracunculus* L. extract was stronger and more potent than the *Origanum majorana* L. extract.

**Keywords:** Antibacterial effect, extract, *Listeria monocytogenes*, pathogen, tarragon

\*\*\*

### Değişik Konsantrasyonlarda ilave Edilen *Artemisia dracunculus* L. ve *Origanum majorana* L. Ekstraktlarının, Hamburger Köftesinde Bulunması Muhtemel Bazı Gıda Kaynaklı Patojen Bakteriler Üzerine Etkileri

### ÖZ

Bu araştırmada hamburger köftesi formülasyonuna dahil edilen farklı konsantrasyonlarda mercanköşk (*Origanum majorana* L.) ve tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) ekstraktlarının, hamburger köftelerinden en çok izole edilen, gıda kaynaklı dört farklı Gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) ve Gram negatif (*Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*), patojen bakteri üzerindeki antibakteriyel etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca ilgili bitki ekstraktlarının, hamburger köftelerinde doğal koruyucular olarak kullanılabilirliği de araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, mercanköşk ve tarhun ekstraktlarının hamburger köftelerine inoküle edilen Gr (+) ve Gr (-) patojen mikroorganizmalar üzerinde güçlü antibakteriyel etki göstererek farklı oranlarda inhibisyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. Çalışma ile ortaya konulan antibakteriyel aktivitenin Gr (-) bakterilere kıyasla Gr (+) bakteriler üzerinde daha yüksek olduğu belirlenmiş olup, en yüksek antibakteriyel etkiyi *Listeria monocytogenes* üzerinde, 3.38 log kob/g düşüş ile %2'lik *Artemisia dracunculus* L. ekstraktının sağladığı belirlenmiştir. Kullanılan ekstraktlarda uygulanan konsantrasyonun artışına paralel olarak, antibakteriyel etkinin artış gösterdiği, ek olarak tarhun ekstraktının sağladığı antibakteriyel etkinin, *Origanum majorana* L. ekstraktına kıyasla daha yüksek ve etkili olduğu da ayrıca saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Antibakteriyel etki, ekstrakt, *Listeria monocytogenes*, patojen, tarhun

To cite this article: Akarca G, Ceran N. Effects of *Artemisia dracunculus* L. and *Origanum majorana* L. Extracts Added in Different Concentrations on Some Possible Foodborne Pathogenic Bacteria in Hamburger Patties. Kocatepe Vet J. (2023) 16(4): 496-503.

Submission: 17.08.2023 Accepted: 13.11.2023 Published Online: 30.11.2023

ORCID ID: G.A: 0000-0002-5055-2722, N.C: 0009-0006-8939-7359

\*Corresponding author e-mail: [gakarca@aku.edu.tr](mailto:gakarca@aku.edu.tr)

## INTRODUCTION

Hamburger is a meat product that can be produced by adding beef fat, seasonings, and salt to fresh or frozen ground beef and is mostly consumed by grilling (Güner and Atasever 2010). In accordance with Turkish Standards, hamburger is defined as a mixture and is prepared in phases. In the very initial step of butchery, the body meats of veal, sheep, and lamb are removed from the bones, cartilage, tendons, lymph nodes, fascia, and nerves. Then, the meat is ground with the addition of breadcrumbs, starch, potato flour, soy proteins, edible soybean flour, flavorings, and additions, along with kidney oil, tallow, tail fat, and edible salt. After being reduced to minced beef, it is then mixed to ensure an equitable distribution (Anonymous 2002).

Ready-to-eat products that have been preserved in the cold for a long period are the ones that pose the most microbiological risks. This risk is fairly considerable because hamburger patties are a quick-consumption product. When foods are maintained at improper temperatures for an extended period of time, they become particularly suited for microbial growth, especially infections. Examples of such foods include hamburger patties. They may therefore result in microorganism-related issues, particularly food poisoning (Koçan and Halkman 2006; Şevik et al. 2021).

A perennial shrub, Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) is one of the species in the *Asteraceae* family (Ceylan 1996). The Northern Hemisphere is home to a large population of *A. dracunculus* L., whose native country is assumed to be Siberia. Tarragon, whose leaves are 2–8 cm long and 2–10 mm wide, can reach 120-150 cm in length (Raghavan 2007). The composition of the essential oil extracted from the leaves of Tarragon has been broken down into more than thirty constituents, and anethole (81.0%),  $\beta$ -ocimene (9.6%), limonene (3.1%) and methyleugenol (1.8%) were listed as the primary components of these oils (Kordali et al. 2005).

When combined with mint and anise, Tarragon results in a pleasing aroma. In addition to being used dried with its stems and leaves, Tarragon L. can also be crushed or ground after drying. According to reports, *A. dracunculus* L. is appetizing and facilitates digestion by increasing digestive secretions, relieves stomach and intestinal gases, and is diuretic. Studies have shown that Tarragon L. is anthelmintic, antibacterial, effective against cramps, and helpful for stomach ailments. Plus, it is utilized in combinations for the treatment of anemia and digestive disorders as well as in antirheumatic mixtures (Azırak 2007).

A member of the *Labiatae* family, the semi-shrub plant Marjoram (*Origanum majorana* L.) belongs to the *Origanum* genus. It is a common spice that comes from the Mediterranean region and is used all around Europe. Other Greek islands, particularly Crete, as

well as the south and west of Turkey are also home to a plethora of its growth (Raghavan 2007).

The chemical composition of the essential oil of Marjoram mainly consists of carvacrol (% 50-82),  $\gamma$ -terpinene (% 0.09- 7), linalool (% 0.04-1.9), thymol (% 0-1.9) and p-cymene (% 0.01-10.9) (Azırak 2007). Marjoram, which has been found to have potent antioxidant and antibacterial activities, additionally has been associated with sedative, cardiovascular, antiseptic, stimulant, and anthelmintic characteristics. (Wetter 2010; Azrak 2007; Raghavan 2007).

The aim of this study is to figure out the antibacterial effects of *O. majorana* L. and *A. dracunculus* L. extracts, which were included in the formulation of hamburger patties, on four different foodborne pathogenic bacteria, most of which were obtained from hamburger patties. It was also looked into whether natural preservatives could be used along with the additional extracts to guarantee the hamburger patties' microbiological dependability.

## MATERIAL and METHOD

### Material

The meat manufacturer in Afyonkarahisar provided the minced meat that was put to use for the production of the hamburger patties that were used in the study. The beef was the ingredient used to make the minced meat, which had a 12% fat level overall. All ingredients (breadcrumbs and onions) were purchased at a chain market, and all spices (including Tarragon and Marjoram), which were used in the preparation of hamburger patties) were purchased from a herbalist working in the province of Afyonkarahisar.

### Extraction of spice extracts

A complete amount of 400 mL of 80% ethyl alcohol was then poured into the dried spices of Tarragon and Marjoram. soon after they had been weighed at 100 g each. The resulting mixes were shaken for 24 hours at 120 rpm using a shaker (Wise Shake®, SHO-2D, Thailand). The mixes were filtered using sterilized 22 mm (Whatman, UK) filter paper at the conclusion of the experiment. The alcohol and extract combination in the filtrate was then separated from one another using a rotary evaporator at 60 °C and 120 rpm (Heidolph Hei-VAP valuei Germany). After that, the extracts were maintained in dark, airtight containers at +4 °C (Akarca et al. 2019).

### Bacteria strains used in the study

In the study, bacterial strains belonging to *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* ATCC 51774, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, and *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 species have been employed.

## Production of hamburger patty

By modifying the formulation proposed by İlhan (2010), the production of the hamburger patties

utilized in the study was accomplished in accordance with the formulation listed in Table 1.

**Table 1.** Hamburger Patties Formulation

Component	Quantity (g)
Beef Meat	500
Onion (Grated)	49.3
Salt	14.1
Sweet Paprika Powder	1.8
Cayenne Pepper Powder	1.8
Balck Pepper	3.5
Breadcrumbs	46.9
Water	63.4

## Preparation of inoculums

The pathogenic bacteria that were employed in the study were grown on non-selective media and were obtained from overnight cultures and single colonies that were growing on their own with the use of sterile loops. These were combined until uniform turbidity was generated in tubes containing Ringer's solution (Merck 1.15525, Germany). A densitometer (Biosan, 1B, Turkey) was used to adjust the density of the produced inoculum suspension so that it satisfied the 0.5 McFarland (8.17 log cfu/mL) standard (Akarca and Şevik 2022). Then, 0.5 Mc Farland standard pathogenic bacteria suspensions (6 log cfu/g) were added into the patty dough separately and the mixture was homogeneously mixed and finally, the hamburger patties were shaped.

## Microbiological analysis

### Preparation of samples for microbiological analysis

With the help of a sterilized spatula, taking 10 g of homogenized hamburger patties samples were weighed, and placed in stomacher bags. 90 mL of 0.1% buffered peptone water (Merck, 107,228, Germany) was added to these and the stomacher (Bag Mixer® 400 P-080921247) was homogenized for one minute. One milliliter (mL) of each sample was drawn out by means of automatic sterile pipettes (Eppendorf, Research Plus), and 9 mL of sterile 0.1% buffered peptone water kept in the tubes was added on top of it, and 10<sup>-2</sup> dilutions were prepared. By continuing the process in this way, serial dilutions up to 10<sup>-5</sup> were prepared (Halkman 2005).

### *Staphylococcus aureus* species bacteria count

Using Baird-Parker Agar (Merck 1.05406, Germany) as the medium, the spread plate method has been employed for calculating the total count of *S. aureus*. Egg yolk-tellurite emulsion (Merck 1.03755, Germany) was added on the medium that has been sterilized and cooled in an autoclave while stirring in a magnetic stirrer and was later mixed well. Afterward, the medium was poured into Petri dishes at a volume

of approximately 12 mL, allowed to disperse properly and allowed to solidify. Then, 0.1 mL of prepared dilutions were inoculated into Petri dishes with the help of an automatic pipette (Eppendorf Research Plus) in double parallel. Later, with the help of a sterile drigalski spatula, the inoculated sample was spread homogeneously in the Petri dish. The petri dishes were inverted and incubated for 24-48 hours at 37°C under aerobic conditions in an incubator (Incucell, MMM, Germany) after permitting the sample to be absorbed by the medium. Black colonies that developed during incubation were identified and counted (ISO 1999).

The Petri dishes underwent a further 18 hours of incubation following the labeling of the colonies. After incubation, typical *Staphylococcus* colonies with white precipitation rings and bright black colonies that do not form zones were counted separately. A coagulase test was subsequently utilized to identify the count of *S.aureus* bacteria by counting the positive colonies from five of each type of colony (Martins et al. 2009).

### *Escherichia coli* species bacteria count

Using Violet Red Bile Agar (Merck 1.01406, Germany) as the medium, the spread plate method was employed for calculating the count of *E. coli*. After the medium has been prepared, poured into petri dishes, and those dishes have solidified, 0.1 mL was inoculated in pairs in parallel from the prepared dilutions, and it was ensured that it spread homogeneously with a drigalski spatula. After the inoculate was absorbed by the medium, the medium was added a second time but less (4-5 mL) onto the solidified medium and mixed. Then, the petri dishes were inverted and left for incubation in an incubator at 37°C for 24-48 hours. At the end of the incubation period, pink colored colonies were marked and counted (ISO 2001a; ISO 2001b).

### *Listeria monocytogenes* species bacteria count

The spread plate method with Fraser Listeria selective enrichment Broth (1.10398.0500) and Oxford Listeria

selective Agar (Merck, 1.07004, Germany) was implemented to acquire an *L. monocytogenes* type bacteria count. The supplements (Fraser Listeria Ammonium Iron (III) Supplement; Merck 1.00092, Germany, and Fraser Listeria Selective Supplement; Merck 1.00093, Germany) were added, and everything was thoroughly mixed, after the Fraser Listeria selective enrichment Broth had been sterilized in an autoclave and cooled to room temperature. 10 g samples were taken from each sample in sterile stomacher bags, and 90 mL of sterile Fraser Listeria selective enrichment broth was added to them and mixed in the stomacher and it was ensured that they are homogenized. Then, these pre-enrichment cultures were incubated for 24 hours in a 37 °C incubator (ISO 2017a; ISO 2017b).

At the end of the period, 1 mL each was taken from the sample and Fraser broth mixtures with the help of a sterile pipette and was transferred to tubes containing 9 mL sterile Fraser broth. This process was continued until 10<sup>-5</sup> as the serial dilutions were got ready. With the help of a sterile automatic pipette, 0.1 mL of the prepared dilutions were taken and inoculated onto Oxford Listeria selective Agar surfaces. The inoculation was then spread homogeneously on the petri dish with a sterile drigalski spatula. Then, the Petri dishes were incubated at 37 °C for 24-48 hours. At the end of the period, colonies with rounded black zones on petri dishes were counted (ISO 2017a; ISO 2017b).

#### **The Count of *Salmonella* Typhimurium**

The count of *S. Typhimurium* was measured by applying spread plate method using Nutrient Broth (Merck, 105443, Germany), Rappaport Vassiliadis Salmonella (RVS) Broth (Merck 107700, Germany) and Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose (BPLS) Agar (Merck, 110747, Germany). Taking 10 g of homogenized hamburger patties samples was taken and placed in sterile stomacher bags, to which 90 mL of Nutrient Broth was added and these were mixed in the stomacher and homogenized. Then, these pre-enrichment cultures were left for incubation for 24 hours in 37 °C incubator. At the end of the period, 1 mL of each inoculate and nutrient broth mixture was taken with the help of a sterile pipette and transferred into tubes containing 9 mL of sterile RVS Broth. Later, serial dilutions up to 10<sup>-5</sup> were prepared. After the incubation of these dilutions at 37 °C for 24 hours, they were inoculated onto BPLS Agar surfaces with the help of an automatic pipette and spread homogeneously with the help of a drigalski spatula. Following this procedure, the petri dishes were inverted and incubated at 37 °C for 24 hours. At the end of incubation, pink colonies with red zones formed on the surface of the medium were counted (ISO, 2017c).

All microbiological analyzes were repeated at 0<sup>th</sup>, 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, and 3<sup>rd</sup> hours in the same way, and the counting

results were calculated as a standard weighted average at consecutive dilutions, and the results are given as "log cfu/g".

#### **Experimental design and statistical analysis**

The factorial structure of the research design, which was totally random, is 4 x 4. Factors are time (zeroth, 1st, 2nd, and 3rd hours) and patty examples (control, M1, M2, T1 and T2). Duncan's multiple range tests (SPSS, version 23) were used to analyze factors to find differences (P<0.05) between samples over time. Replications were used to totally randomize the design.

## **RESULTS and DISCUSSION**

#### **The count of *Staphylococcus aureus***

The initial *S. aureus* measurements were reported to range from 6.07 to 6.17 log cfu/g in hamburger patties created through adding extracts of Tarragon and Marjoram at various ratios (Table 2; p>0.05). This amount increased by 0.32 log cfu/g in the control sample after three hours (p>0.05). On the other hand, it was shown that there was a decline in the samples throughout this time to which spice extract was added at various rates (p<0.05). It was figured out that the highest decrease was in the samples to which 2% Tarragon extract was added with a rate of 2.27 log cfu/g. This was followed by the samples produced by adding 1% extracts of Tarragon at 1.91 log cfu/g, Marjoram at 1.41 log cfu/g, 2%, and by the samples produced with the addition of 1% extracts of Marjoram at a ratio of 1.31 log cfu/g (Table 2).

Other samples were confirmed to be statistically significant (p<0,05) aside from the control sample, which displayed a time-dependent decline in the quantity of *S. aureus* bacteria inoculated into the hamburger samples. The same time period also revealed statistical significance for *S. aureus*-inoculated hamburger samples, and all time periods but the zeroth hour (p<0.05) displayed statistical significance for the decline in bacterial counts.

Corresponding to the findings of this research, Sağıç (2003) looked into the effects of *Origanum majorana* L. species used in food production on four different food-borne pathogenic bacteria and assessed the inhibition effect. The study found that *S. aureus* is the bacteria that is most vulnerable to the Marjoram. Shan et al (2007) investigated the antibacterial effect of a total of 46 plant and spice extracts on 5 foodborne pathogenic bacteria (*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* and *S. Anatum*). The study results suggested that compared to Gr (-) bacteria, Gr (+) bacteria are more sensitive and stated that the most resistant bacteria are *E. coli* and the most sensitive bacteria is *S. aureus*. In addition to that, in a study by Lacroix et al (2006), it was detected that *E. coli* O157:H7, food pathogens of the spice Marjoram., showed high antimicrobial activity against



food pathogens such as *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* and *S. aureus*. In another study, in which *S. aureus* was inoculated into feta cheese with

Marjoram and Cinnamon extracts added, it has been reported that Cinnamon and Marjoram extracts have an inhibitory effect on *S. aureus* (Kahraman 2017).

**Table 2.** Time-dependent variation in inoculated *Staphylococcus aureus* counts (0/25g Log cfu/g)

Samples	Initial microorganism load	0.Hour	1.Hour	2. Hour	3.Hour
Control	<1	6.07±0.01 <sup>Aa</sup>	6.92±0.03 <sup>Aa</sup>	6.70±0.02 <sup>Aa</sup>	6.39±0.01 <sup>Aa</sup>
Tarragon 1%	<1	6.14±0.03 <sup>Aa</sup>	5.91±0.02 <sup>ABab</sup>	4.80±0.02 <sup>Bb</sup>	4.23±0.03 <sup>Bbc</sup>
Tarragon 2%	<1	6.17±0.01 <sup>Aa</sup>	5.76±0.03 <sup>ABb</sup>	4.54±0.01 <sup>Bb</sup>	3.90±0.05 <sup>Cc</sup>
Marjoram 1%	<1	6.14±0.02 <sup>Aa</sup>	6.08±0.02 <sup>Aa</sup>	5.49±0.03 <sup>ABab</sup>	4.83±0.03 <sup>Bb</sup>
Marjoram 2%	<1	6.17±0.01 <sup>Aa</sup>	5.99±0.01 <sup>ABab</sup>	5.36±0.03 <sup>ABab</sup>	4.76±0.04 <sup>Bb</sup>

A-C (→): Values shown with different letters on the same line differ from each other at the p<0.05 level

a-c (↓): Values shown with different letters on the same column differ from each other at the p<0.05 level

### The count of *Escherichia coli*

Introductory *E. coli* counts were observed to vary between 6.47 and 6.50 log cfu/g in hamburger patties that had Tarragon and Marjoram extracts added at various rates (Table 3; p>0.05). Three hours later, it was discovered that the quantity of *E. coli* had decreased in all samples. With the exception of the control sample, it was found that this drop was statistically significant in the other samples (p<0.05). In a similar way, it was decided that the decrease in bacterial counts in the hamburger patties inoculated with *E. coli* in the same period of time was statistically significant in all other time periods except the zeroth time (p<0.05). It was obtained that the highest decrease was observed in hamburger patties produced by adding 2% Tarragon extract at a rate of 2.85 log cfu/g, and this was followed by the samples produced by adding 1% Tarragon extract at a rate of 2.09 log cfu/g, and the samples produced by adding 2% of Marjoram extract at a rate of 1.09 log cfu/g (Table 3), respectively.

In a study, Ehrich et al. (1995) investigated the effects of 38 kinds of spices against pathogenic bacteria such as *S. epidermidis*, *E. coli* and some mold types. The study results indicated that Tarragon and Marjoram.

spices were among the spices that displayed the most antimicrobial effect among the extracts. Moreover, in the study carried out by Pişkin (2007), it was maintained that the essential oil obtained from the Marjoram plant showed the highest antimicrobial effect against *E. coli* with a concentration range of 0.4-0.0007 µl/ml. Turhan (2015) executed a study investigating the antimicrobial effect of some spice essential oils on *E. coli* and found that Marjoram plant affirmed the highest antimicrobial effect on *E. coli* and expressed that Marjoram plant formed the largest inhibition zones. Turhan (2015) also revealed in the same study that 5-10-15 µL of Marjoram essential oil completely inhibits bacterial growth.

Another study focused on the sausage-infused essential oil of Marjoram to find out how it affected inhibition. In the investigation, bacteria from the species *B. subtilis*, *S. choleraeensis*, *S. flexneri*, *S. aureus*, and *E. coli* were employed. According to the results of the research, gram negative bacteria can be inhibited much more easily by using Marjoram essential oil (Busatta et al., 2008). The results of similar studies on the subject are similar to the results obtained in this study.

**Table 3.** Time-dependent variation in inoculated *Escherichia coli* counts (0/25g Log cfu/g)

Samples	Initial microorganism load	0.Hour	1.Hour	2. Hour	3.Hour
Control	<1	6.47±0.03 <sup>Aa</sup>	6.40±0.03 <sup>Aa</sup>	6.20±0.04 <sup>Aa</sup>	6.00±0.03 <sup>Aa</sup>
Tarragon 1%	<1	6.47±0.02 <sup>Aa</sup>	5.52±0.02 <sup>ABb</sup>	4.68±0.03 <sup>Bb</sup>	4.38±0.02 <sup>Bb</sup>
Tarragon 2%	<1	6.51±0.01 <sup>Aa</sup>	5.25±0.04 <sup>Bb</sup>	4.27±0.04 <sup>BCb</sup>	3.66±0.02 <sup>Cc</sup>
Marjoram 1%	<1	6.51±0.04 <sup>Aa</sup>	6.30±0.03 <sup>Aa</sup>	6.08±0.02 <sup>Aa</sup>	5.63±0.02 <sup>Bab</sup>
Marjoram 2%	<1	6.50±0.04 <sup>Aa</sup>	6.17±0.05 <sup>ABab</sup>	5.68±0.03 <sup>Bab</sup>	5.41±0.03 <sup>Bab</sup>

A-C (→): Values shown with different letters on the same line differ from each other at the p<0.05 level

a-c (↓): Values shown with different letters on the same column differ from each other at the p<0.05 level

### The count of *Salmonella Typhimurium*

Through the application of two different ratios of Marjoram and Tarragon extract, it was conceivable to acquire initial count of *S. Typhimurium* bacteria type inoculated into hamburger patties that differed between 6.55 and 6.52 log cfu/g (Table 4; p>0,05). All samples established a downward trend in *S. Typhimurium* bacteria throughout the course of the three-hour storage period, and all samples other than the control sample exhibited this decline to be

statistically significant (p<0.05). Over and above, it was revealed that the decrease in the count of bacteria in the same time period of the samples inoculated with *S. Typhimurium* type bacteria was also statistically significant in all other time periods except the first hour (p<0,05). It was resolved that the highest decrease among the samples was in the samples produced by adding 2% Tarragon extract with a value of 2.66 log cfu/g (p<0.05). It was specified that this

sample was followed by the sample adding 1% Tarragon extract with a value of 2.38 log cfu/g and the other was produced by adding 2% of Marjoram extract with a value of 1.74 log cfu/g, respectively ( $p < 0.05$ ).

Consistent with the results of this research, Chaudhry et al. (2007) investigated the antibacterial effect of *Origanum majorana* L. (Marjoram) plant for Gram (-) bacteria in research they performed in Pakistan. It has been uttered that the chemical compounds such as thymol and carvacrol in the content of this plant, have antimicrobial effects on other Gr (-) bacteria species, especially *Salmonella* subsp. and *E. coli*. In a study undertaken by Özcan and Erkmén (2001), the effects of nine distinct plants on 11 various microorganisms, including *S. Typhimurium*, were analyzed. The researchers concluded that the

antimicrobial activity of the Marjoram plant is extremely strong. Four different foodborne pathogenic bacteria, including *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* and *B. Cereus*, were addressed by Bonyadian and Moshtaghi (2008) in order to assess the antibacterial effect of Tarragon. The most sensitive bacteria, according to the findings of this study, is *S. Typhimurium*.

Govaris et al. (2010) identified the antibacterial effect of Marjoram essential oil by inoculating *Salmonella* subsp. into minced meat produced from lamb and after 12 days of storage, they found that 0.6% Marjoram essential oil exhibited a strong antimicrobial effect. According to Babacan et al. (2012), Marjoram extract possesses strong antibacterial effect on *Salmonella* serotypes.

**Table 4.** Time-dependent variation in inoculated *Salmonella Typhimurium* counts (0/25g Log cfu/g)

Samples	Initial microorganism load	0.Hour	1.Hour	2. Hour	3.Hour
Control	<1	6.55±0.02 <sup>Aa</sup>	6.45±0.03 <sup>Aa</sup>	6.44±0.03 <sup>Aa</sup>	6.40±0.02 <sup>Aa</sup>
Tarragon 1%	<1	6.52±0.01 <sup>Aa</sup>	6.07±0.04 <sup>Aab</sup>	4.92±0.02 <sup>Bb</sup>	4.14B±0.03 <sup>bc</sup>
Tarragon 2%	<1	6.51±0.02 <sup>Aa</sup>	5.49±0.02 <sup>Bb</sup>	4.80±0.05 <sup>Cb</sup>	3.85±0.05 <sup>Dc</sup>
Marjoram 1%	<1	6.54±0.03 <sup>Aa</sup>	6.44±0.01 <sup>Aa</sup>	5.59±0.01 <sup>Bab</sup>	5.11±0.06 <sup>Bb</sup>
Marjoram 2%	<1	6.52±0.01 <sup>Aa</sup>	6.27±0.03 <sup>ABab</sup>	5.27±0.04 <sup>Bab</sup>	4.78±0.02 <sup>Cbc</sup>

A-D (→): Values shown with different letters on the same line differ from each other at the  $p < 0.05$  level

a-c (↓): Values shown with different letters on the same column differ from each other at the  $p < 0.05$  level

### The count of *Listeria monocytogenes*

It was judged that the initial *L. monocytogenes* count in hamburger patties produced by adding Tarragon and Marjoram extracts at differing ratios rank between 6.55 and 6.52 log cfu/g (Table 5;  $P > 0.05$ ). During the three-hour study period, the count of *L. monocytogenes* bacteria decreased in all samples. Whereas, this decrease was found to be statistically significant in the other samples except for the control sample ( $P < 0.05$ ). In addition, it was decided that the decrease in the count of bacteria occurring in the same time period in hamburger patties inoculated with *L. monocytogenes* bacteria was also statistically significant in all other time periods except the first hour ( $P < 0.05$ ). It was evaluated that the greatest decrease occurred in the samples was in the samples produced by adding 2% Tarragon extract at a rate of 3.38 log cfu/g. ( $P < 0.05$ ). It was considered that this sample was followed by the samples produced by adding 1% *A. dracunculus* L. (Tarragon) extract at a rate of 2.59 log cfu/g, the samples produced by adding 2% *O. majorana* L. (Marjoram) extract at a rate of 1.44 log cfu/g, and by the samples produced by adding 1% Marjoram extract, respectively (Table 5).

In a study conducted by Ting and Deibel (1992), which examined the impact of various spices on the reproduction of *L. monocytogenes*, it came to light that the *O. majorana* L. plant is successful. Dadaloğlu and Evrendilek (2004) investigated the antimicrobial effect of Marjoram on food-borne pathogenic bacteria such as *Salmonella* subsp., *E. coli*, *S. aureus* and *L. monocytogenes*. According to the study results,

Marjoram is an effective antibacterial. According to Al-Joboury (2015), *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *E. coli*, *B. abortus*, and *L. monocytogenes* are just a few of the foodborne pathogens that Marjoram extract is effective against. What is more, Ökmen et al. (2017) reported that *O. majorana* L. extract has a strong antibacterial effect on *L. monocytogenes*. The results obtained from similar studies on the subject show parallelism with the data obtained in this study.

The antibacterial effect exerted by the extracts of Tarragon and Marjoram is likely due to the reaction of these components with sulfhydryl groups or as a result of enzyme inhibition of oxidized compounds through more nonspecific interactions with proteins. Consequently, it damages the integrity of the cell wall by affecting pH homeostasis and the balance of inorganic ions (Lambert et al. 2001).

There are a couple of exceptions, yet studies have demonstrated that Gr (+) bacteria are more susceptible to plant extracts than Gr (-) bacteria (Burt 2004; Kalemba and Kunicka 2003). In addition to the cell wall elements present in gram negative bacteria, the inclusion of an extra layer of lipopolysaccharide may result in the formation of an intact plasma membrane that has a higher capacity for buffering and hydrophobicity around the cell wall. As a result, it can prevent simple phenolic compounds from acting in a way that makes bacteria more resistant to flavonoids and polyphenols (Yashaswini and Arvind 2018; Du et al. 2011). These assertions are supported by the findings of this investigation.

**Table 5.** Time-dependent variation in inoculated *Listeria monocytogenes* counts (0/25g Log cfu/g)

Samples	Initial microorganism load	0.Hour	1.Hour	2. Hour	3.Hour
Control	<1	6.55±0.02 <sup>Aa</sup>	6.50±0.02 <sup>Aa</sup>	6.50±0.03 <sup>Aa</sup>	6.15±0.01 <sup>Aa</sup>
Tarragon 1%	<1	6.52±0.03 <sup>Aa</sup>	5.61±0.04 <sup>ABb</sup>	4.74±0.06 <sup>Bb</sup>	3.93±0.02 <sup>Cbc</sup>
Tarragon 2%	<1	6.55±0.03 <sup>Aa</sup>	5.30±0.06 <sup>ABb</sup>	3.99±0.08 <sup>Bc</sup>	3.17±0.05 <sup>Bc</sup>
Marjoram 1%	<1	6.55±0.04 <sup>Aa</sup>	6.41±0.07 <sup>Aa</sup>	6.17±0.04 <sup>ABab</sup>	5.79±0.03 <sup>Bab</sup>
Marjoram 2%	<1	6.52±0.02 <sup>Aa</sup>	6.11±0.05 <sup>ABab</sup>	5.79±0.03 <sup>Bab</sup>	5.08±0.02 <sup>Bb</sup>

A-C (→): Values shown with different letters on the same line differ from each other at the p<0.05 level

a-c (↓): Values shown with different letters on the same column differ from each other at the p<0.05 level

## CONCLUSION

The antimicrobial effects of *O. majorana* L. (Marjoram) and *A. dracuncululus* L. (Tarragon) extracts added to hamburger patties on four different foodborne pathogenic bacteria, Gr (+) (*S. aureus*, *L. monocytogenes*) ve Gr (-) (*S. Typhimurium*, *E. coli*), were investigated in this research. As a result, it was concluded that Marjoram and Tarragon extracts exhibited strong antibacterial effects on inoculated Gr (+) and Gr (-) bacteria and caused inhibition at different rates. It was ended that the antibacterial effect revealed by the study was higher on Gr (+) bacteria compared to Gr (-) bacteria, and it was identified that 2% Tarragon extract supplied the highest antibacterial effect on *L. monocytogenes* with a decrease of 3.38 log cfu/g. It was ascertained that the antibacterial effect enhanced concurrently with the application of more extracts at a particular concentration level. In addition, it has been uncovered that compared to the Marjoram extract, the antibacterial effect of Tarragon extract is higher and more effective.

Consumer preferences have shifted as a consequence of studies revealing that synthetic preservatives used in food manufacturing around the world cause serious medical conditions, particularly cancer. Manufacturers were forced to concentrate on products generated with more natural ingredients as a result. Furthermore, there have been more studies on spices as a result of the identification of the protective implications of spices in foods by demonstrating antimicrobial activity.

The necessity of employing spices in foods becomes evident when taking into account the adverse effects of chemical and synthetic preservatives employed in the food business on the human body. Spices are capable of being used in place of non-organic preservatives in foodstuffs. In this way, it has been demonstrated by the studies that the consumption of organic products can be increased and the public health can be increased.

Consequently, the results of this study demonstrated that the application of Marjoram and particularly Tarragon plants can enhance the microbiological quality of hamburger patties, which are popular both internationally and in Turkey. It is believed that by using this technique, food poisoning that can arise from consumption of these patties can be decreased while the safety of hamburger patties, which present a

risk to the public's health, can be organically increased.

**Funding:** The Scientific Research Projects Coordinatorship of Afyon Kocatepe University (Project number: 20. Fen.Bil.54) has provided funding for this project.

**Conflict of interest:** The authors are genuine for this manuscript, no potential or perceived conflicts of interest have declared.

**Authors Contribution Rate:** Authors are equal to the article declared that they have contributed significantly.

## REFERENCES

- Akarca, G., Sevik, R. (2022). Biological Activities of *Citrus limon* L. and *Citrus sinensis* L. Peel Essential Oils. J Essent Oil Bear Plant., 24(6): 1415-1427.
- Akarca, G., Tomar, O., Güney, İ., Erdur, S., & Gök, V. (2019). Determination of sensitivity of some food pathogens to spice extract. J Food Sci. Technol., 56(12): 5253-5261.
- Al-Joboury, & Th. MA. (2015). Effect of crude extract of *Origanum vulgare* on the inhibition of some pathogenic bacteria and causing spoilage of food. Al-Anbar J. Vet. Sci., 8(2): 6527-28.
- Anonymous. (2002). Turkish Standards Institute meatball and hamburger patty standard, TS 1058.0 Ankara, Türkiye.
- Bonyadian M., & Moshtaghi H. (2008). Bactericidal activity of essential oils of some plants against *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. Res J Microbiol., 3: 648-653.
- Burt S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods A review. Int. J. Food Microbiol, 94: 223-253.
- Busatta C., Vidal RS., Popiolski AS., Mossi AJ., Dariva C., Rodrigues MR., Corazza FC., Corazza ML., Vladimiro Oliverira J. & Cansian RL. (2008). Application of 81 *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. Food Microbiol., 25(1): 201–211.
- Chaudhry, NMA., Saeed, S., & Tariq, P. (2007). Antibacterial effects of oregano (*Origanum Vulgare*) against gram negative bacilli. Pak. J. Bot., 39: 609-613.

- Cowan, MM. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiol. Rev.*, 12: 564–568.
- Dadaloğlu I., & Evrendilek G. (2004).** Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula Stoechas* L.) and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 8255-8260
- Du, WX., Olsen, CW., Avena-Bustillos, RJ., Friedman, M., & Mc. Hugh, TH. (2011).** Physical and antibacterial properties of edible films formulated with apple skin polyphenols. *J Food Sci.*, 76(2): 149-155.
- Ehrich, J., Baumann, U. & Thomann, R. (1995).** Antimicrobial effect of CO spice extracts from summer savory to cinnamon. *Lebensmitteltechnik*, 27(11): 51-53.
- Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., & Chatzopoulou PS. (2010).** The Antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *Int. J. of Food Microbiol.*, 137: 175-180.
- Halkman, K. (2005).** Food Microbiology Applications. Başak Printing and Promotional Services Ankara-Turkiye.
- İlhan, E. (2010).** Effect of Rosemary extract utilization on storage stability of hamburger patties formulated with different beef trimming ratios. Msc. Thesis. Ankara University , Ankara, Turkiye.
- ISO. (1999).** International Standard Organization, 6888-1 Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase-positive Staphylococci Technique using Baird Parker Agar Medium. Geneva, Switzerland.
- ISO. (2001a).** International Standard Organization. 16649-1:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase positive *Escherichia coli*- Part 1: Colony count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo- 4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. Geneva, Switzerland.
- ISO. (2001b).** International Standard Organization. 16649-2:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase positive *Escherichia coli*- Part 2: Colony count technique at 44 degrees C using 5- bromo-4-chloro-3-indolyl beta – Dglucuronide. Geneva, Switzerland
- ISO. (2017a).** International Standard Organization, 11290-1:2017 Microbiology of the food chain, Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method. Geneva, Switzerland.
- ISO. (2017b).** International Standard Organization. 11290-2:2017 Microbiology of the food chain, Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Geneva, Switzerland
- ISO. (2017c).** International Standard Organization, 6579-1:2017 Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*. Geneva, Switzerland
- Kahraman A. (2017)** Examination of some food pathogens' reproductive and survival abilities at feta cheese which had been added Marjoram and Cinnamon. Msc. Thesis. Afyon Kocatepe University. Afyonkarahisar, Turkiye.
- Kalemba, DAAK., & Kunicka, A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem.*, 10(10): 813-829.
- Lacroix, M., Saucier, L., Caillet, S. & Qussalah. (2006).** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E.coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Cont.*, 18(5): 414-420
- Lambert, RJW., Skandamis, PN., Coote, PJ., & Nychas, GJE. (2001).** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl. Microbiol.*, 91: 453–462.
- Martins, IM., Kabuki, DY., & Kuaye, Y. (2009).** Determination and characterization of pathogens found in dairy products. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Adolfo Lutz*, 68(3): 359-365.
- Ökmen G., Arslan A., Vurkun M., & Ceylan O. (2017).** Antimicrobial and antioxidant activities of different spices. Kötekli, *Electronic Microbiology Journal*, 15(1): 16-28.
- Özcan, M., & Erkmen, O. (2001).** Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *Eur. Food Res. Technol.*, 212: 658-660.
- Pişkin Ç. (2007).** The determination of antimicrobial effects of some spices plants of *Lamiaceae*. MSc. Thesis. Seck University, Konya, Turkiye.
- Sağdıç, O. (2003).** Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish Thyme and Oregano hydrosols. *Lebensm.-Wiss.-u.-Technol.*, 36:467-473.
- Shan, B., Cai, Y., Brooks, JD. & Corke, H. (2007).** The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int. J Food Microbiol.*, 117: 112-119.
- Ting, WTE., & Deibel, KE. (1992).** Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to spices at two temperatures. *J. Food Safety.*, 12(2): 129-137.
- Turhan D. (2015).** Investigation of the antimicrobial effect of some essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Msc. Thesis. Istanbul Technical University. Istanbul, Turkiye.
- Yashaswini, P., & Arvind. (2018).** Antimicrobial properties of orange (*Citrus reticulata* var. *kinnow*) peel extracts against pathogenic bacteria. *Int J Curr Microbiol App Sci.*, 7(3): 737-746.

## Effect of Alpha Lipoic Acid on Polychlorinated Biphenyl (Aroclor 1254)-Induced Nephrotoxicity in Rats

Mustafa YILDIZ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Occupational Health and Safety, Çan Faculty of Applied Sciences, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Türkiye

### ABSTRACT

The present study aimed to determine the morphological changes in rat kidneys exposed to PCB (Aroclor 1254) and to reveal the effects of ALA on those changes. Rats were randomly divided into four groups: Control, ALA, PCB and ALA+PCB. The applications of ALA and PCB continued for thirty days. At the end of the experiment, the tissue samples were taken from the animals. Crossmon's triple staining method was applied to kidney sections for histopathological and histomorphometric examinations. In addition, the periodic acid-Schiff (PAS) reaction was examined in tissue sections. Histopathologically, it was determined that glomerular degeneration and connective tissue densities in the kidney significantly increased in PCB group compared to Control group. Besides, it was found that glomerular degeneration intensity significantly decreased in ALA+PCB group compared to PCB group. It was detected that the diameters of the renal corpuscle, proximal tubule, ascending limb of Henle's loop and collecting duct in the kidney significantly decreased in PCB group compared to Control group. However, these parameters significantly increased in ALA+PCB group compared to PCB group. While the density of glomerular mesangial matrix and glycogen density in proximal tubule epithelium significantly increased in PCB group compared to Control group, these parameters significantly decreased in ALA+PCB group compared to PCB group. As a result, PCB may adversely affect renal functions by causing disorders in kidney histology. In addition, the use of ALA against PCB exposure may contribute to the preservation of kidney tissue.

**Keywords:** Alpha lipoic acid, Aroclor 1254, Histology, Kidney, Rat

\*\*\*

### Sıçanlarda Poliklorlu Bifenil (Aroklor 1254) ile Oluşturulan Nefrotoksisite Üzerine Alfa Lipoik Asitin Etkisi

#### ÖZ

Sunulan çalışma, PCB (Aroklor 1254)'ye maruz bırakılan sıçanların böbreklerdeki morfolojik değişikliklerin belirlenmesini ve bu değişiklikler üzerine ALA'nın etkilerinin ortaya çıkarılmasını amaçladı. Sıçanlar kontrol, ALA, PCB ve ALA+PCB olmak üzere rastgele dört gruba ayrıldı. ALA ve PCB uygulamaları otuz gün boyunca devam etti. Deney sonunda hayvanlardan doku örnekleri alındı. Histopatolojik ve histomorfometrik incelemeler için böbrek kesitlerine Crossmon'un üçlü boyama yöntemi uygulandı. Ayrıca doku kesitlerinde periyodik asit-Schiff (PAS) reaksiyonu incelendi. Histopatolojik açıdan, böbrekte glomerüller dejenerasyon ile bağ doku yoğunluklarının kontrol grubuna göre PCB grubunda anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi. Bununla birlikte, glomerüller dejenerasyon yoğunluğunun PCB grubuna göre ALA+PCB grubunda anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı. Böbrekte *renal korpuskül*, proksimal tübül, çıkan henle ve toplayıcı kanal çaplarının kontrol grubuna göre PCB grubunda anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi. Ancak bu parametreler PCB grubuna göre ALA+PCB grubunda anlamlı bir şekilde arttı. Böbrekte glomerüller mezengial matriks yoğunluğu ile proksimal tübül epitelindeki glikojen yoğunluğu kontrol grubuna göre PCB grubunda anlamlı bir şekilde artarken, bu parametreler PCB grubuna göre ALA+PCB grubunda anlamlı bir şekilde azaldı. Sonuç olarak, PCB böbrek histolojisinde bozukluklara neden olarak renal fonksiyonları olumsuz etkileyebilir. Bununla birlikte, PCB maruziyetine karşı ALA kullanımı böbrek dokusunun korunmasına katkı sağlayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Alfa lipoik asit, Aroklor 1254, Böbrek, Histoloji, Sıçan

To cite this article: Yıldız M. Effect of Alpha Lipoic Acid on Polychlorinated Biphenyl (Aroclor 1254)-Induced Nephrotoxicity in Rats. Kocatepe Vet J. (2023) 16(4):504-512

Submission: 21.09.2023 Accepted: 21.11.2023 Published Online: 30.11.2023

ORCID ID: MY: 0000-0003-4128-8947

\*Corresponding author e-mail: [mustafayildiz@comu.edu.tr](mailto:mustafayildiz@comu.edu.tr)

## INTRODUCTION

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are compounds that are found in many industrial products and cause environmental pollution (Aydin et al. 2007). PCBs are frequently used in printing ink, pesticides, adhesives, fluorescent lamps, machine oils and dental filling materials (Lindell 2012). Exposure to PCBs occurs through their transfer to air, soil and water systems during production or usage (Bruner-Tran and Osteen 2010). The exposure through digestion usually carries out with the consumption of contaminated fish (Seyran and Erisir 2008). It has also been determined that PCBs pass to the fetus via the placenta and to the newborn via milk (Lilienthal et al. 2000). PCBs tend to accumulate in adipose tissue due to their lipophilic properties (Carpenter 2005). This is a clear indication that the health of people exposed to PCBs is at risk for a long time (Seyran and Erisir 2008). Besides, it has been reported that PCBs have carcinogenic, immunosuppressive, disrupting the functions of the genital system and hormonal system, neurotoxic and hepatotoxic effects (Oskam et al. 2004; Hsu et al. 2007; Murugesan et al. 2007).

PCB exposure reduces kidney weight (Banudevi et al. 2006) and significantly increases serum urea, creatinine and uric acid levels (Kutlu et al. 2007). In addition, it has been found that PCBs cause histopathological lesions such as apoptosis (Ghosh et al. 2010) enlargement of tubular cells, vacuole formation, necrosis (Raja et al. 2019), inflammation (Sula et al. 2020), edema, congestion (Lu et al. 2009) and corpuscular atrophy in kidney tissue (Kutlu et al. 2007). On the other hand, PCB decreases the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) in kidney tissue, in contrast, increases lipid peroxidation, hydrogen peroxide and hydroxyl radical levels (Banudevi et al. 2006).

Alpha lipoic acid (ALA) is a fatty acid with strong antioxidant activity. It is found in foods such as red meat, broccoli, spinach, tomatoes and peas (Karaca and Sozbilir 2007). Also, it is synthesized by lipoic acid synthase in mitochondria intracellularly (Padmalayam et al. 2009). The antioxidant effect of ALA is not only through its suppression of free radical formation but also indirectly through the reuse of other cellular antioxidants (Guimaraes et al. 2007). Due to the antioxidant role of ALA, its positive effects have been observed in various pathological conditions such as diabetes, atherosclerosis, neuron degeneration, multiple sclerosis and joint diseases (Singh and Jialal 2008).

Results of studies that use different experimental models demonstrated that ALA decreased the plasma urea level (Pradhan et al. 2013) and the degree of polyuria by increasing the urine osmolality (Bae et al. 2009). Similarly, ALA significantly reduced

glomerular and vascular damage, leukocyte infiltration (Mervaala et al. 2003), tubulointerstitial fibrosis (Bhatti et al. 2005), basement membrane thickening (Winiarska et al. 2008), tubular dilatation, mesangial enlargement (Oksala et al. 2007), vacuolization (El-Sawalhi and Raafat 2007), collagen deposition (Grdović et al. 2021), as well as the rates of congestion and apoptosis in the kidney tissue (Cakir et al. 2015). In addition, while the expression of Bcl-2 increased, the Bax (Gultekin et al. 2021) and caspase 3 expressions, which play a role in the apoptotic process decreased with the use of ALA in the kidney tissue (Oktan et al. 2021). On the other hand, ALA caused a significant increase in GPx, CAT and GSH levels, as well as a decrease in MPO activity and MDA level in kidney tissue (Jamor et al. 2019).

The present study aimed to examine the morphological changes in the kidneys of rats with PCB toxicity and to reveal the effects of ALA on those changes.

## MATERIAL and METHODS

### Animals

Thirty-two 3-month-old Wistar Albino adult male rats were used in the study. The rats were obtained from Aydin Adnan Menderes University Experimental Animals Unit. The rats had ad libitum to water and food in a controlled environment at a temperature of  $22\pm 1$  °C, following a 12-hour light/dark cycle. The study was carried out with the permission of Aydin Adnan Menderes University Animal Experiments Local Ethics Committee (No: 64583101/2021/180).

### Experimental Design

The rats were randomly divided into four groups; Control (n=8), ALA (n=8), PCB (n=8) and ALA+PCB (n=8). The control group received corn oil at a dose of 2 ml.kg<sup>-1</sup> by oral gavage for 30 days. ALA group was administered 25 mg.kg<sup>-1</sup> of ALA (Sigma T5625, Schnelldorf, Germany) dissolving in 2 ml.kg<sup>-1</sup> corn oil by oral gavage for 30 days. The PCB group was supplemented with 5 mg.kg<sup>-1</sup> of PCB (Sigma 48586, Schnelldorf, Germany) dissolved in 2 ml.kg<sup>-1</sup> corn oil by oral gavage for 30 days. ALA+PCB group was treated with 25 mg.kg<sup>-1</sup> of ALA dissolved in 1 ml.kg<sup>-1</sup> corn oil and one hour later 5 mg.kg<sup>-1</sup> of PCB dissolved in 1 ml.kg<sup>-1</sup> corn oil was applied by oral gavage for 30 days (Gules and Eren 2016).

### Sample Collection and Preparation

At the end of the experiment, the rats were anesthetized by intraperitoneal (ip) administration of 80 mg.kg<sup>-1</sup> of ketamine (Pfizer, Istanbul, Turkey) and 20 mg.kg<sup>-1</sup> of xylazine (Bayer, Istanbul, Turkey). Then, a midline incision was made in the abdominal wall of the animals that were killed by cervical

dislocation. Kidney tissues were removed from the abdomen. The right kidney tissue was fixed in 10% buffered neutral formalin solution for 24 hours. Following standard histological processing, the tissue samples were embedded in paraffin and serial sections were obtained at intervals of 100  $\mu\text{m}$ , each being 5-6  $\mu\text{m}$  thick.

### Histomorphometric Analysis

Histomorphometric examinations were carried out on tissue sections stained with Crossmon's triple staining method. The diameters of the renal corpuscle, proximal tubule, distal tubule, ascending limb of Henle's loop and collecting duct were measured in the sections. Histomorphometric measurements were executed by making five different measurements on five sections of each animal at 40x magnification. All microscopic processes were made by a light microscope (SOIF BK5000-TR/L, Denmark) equipped with an image analysis system (MShot Digital Imaging System, China). In addition, photographs were taken with a camera (MShot MD 50, China) from the necessary parts of the sections.

### Histopathological and Histochemical Analyzes

The kidney sections were stained with Crossmon's triple staining method for histopathological evaluation. Tissue sections were examined in terms of glomerular degeneration and connective tissue densities. In histopathological examination, scoring was made for each parameter in three sections of each animal. In the histochemical examination, the sections were stained with the Periodic acid-Schiff (PAS) staining method to reveal neutral mucosubstance and glycogen. As a result of the staining, glomerular mesangial matrix density and glycogen density in the proximal tubule epithelium were evaluated. The densities of histochemical parameters were determined in 10 different structures of three sections belonging to each animal by scoring for each parameter. The sections' histopathological and histochemical evaluations were made semi-quantitatively and scored between 0-3 (0 = none; 1 = weak; 2 = moderate; 3 = severe)(Sirca et al. 2012).

### Statistical Analysis

Data were analysed with SPSS 17.00 package program. Whether there was a difference between the groups was determined by one-way analysis of

variance (ANOVA). The post hoc Duncan test was applied to detect which group or groups caused the difference. Data are presented as mean  $\pm$  Standard Error. Values with differences of  $p < 0.01$  (\*\*) and  $p < 0.001$  (\*\*\*) were considered statistically significant (Gules et al. 2022).

## RESULTS

In the histomorphometric analysis performed on kidney tissue; the diameters of the renal corpuscle, proximal tubule, distal tubule, ascending limb of Henle's loop and collecting duct were measured in the Control and Experimental groups. The data are shown in Table 1. It was determined that the diameters of the renal corpuscle, proximal tubule, ascending limb of Henle's loop and collecting duct in the kidney significantly decreased in the PCB group compared to the Control group. At the same time, they significantly increased in the ALA+PCB group compared to the PCB group ( $p < 0.001$ ). There was no significant difference between the groups in terms of distal tubule diameter (Figure 1 and Figure 2).

In the histopathological analysis of kidney tissues, the Control and Experimental groups were examined in terms of glomerular degeneration and connective tissue densities. The obtained data are given in Table 2. It was detected that glomerular degeneration and connective tissue densities significantly increased in the PCB group compared to the Control group ( $p < 0.001$ ). Also, it was found that glomerular degeneration significantly decreased in the ALA+PCB group compared to the PCB group. However, there was no significant difference in connective tissue density between PCB and ALA+PCB groups (Figure 3).

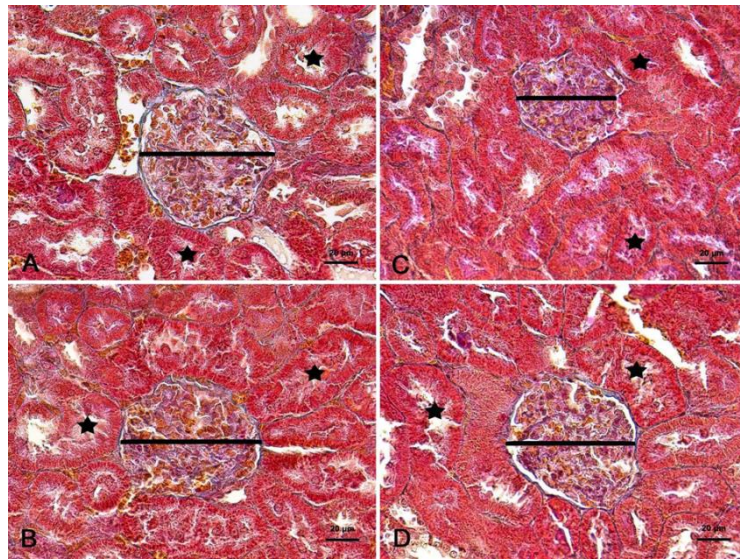
In the histochemical analysis carried out on kidney tissue, the Control and Experimental groups were examined in terms of glomerular mesangial matrix density and glycogen density in the proximal tubule epithelium. The obtained data are shown in Table 3. It was determined that the PAS-positive reaction densities in the glomerular mesangial matrix and proximal tubule epithelium significantly increased in the PCB group compared to the Control group, and they significantly decreased in the ALA+PCB group compared to the PCB group ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ) (Figure 4).

**Table 1.** Histomorphometric values that were obtained from the kidney tissues of Control and Experimental groups.

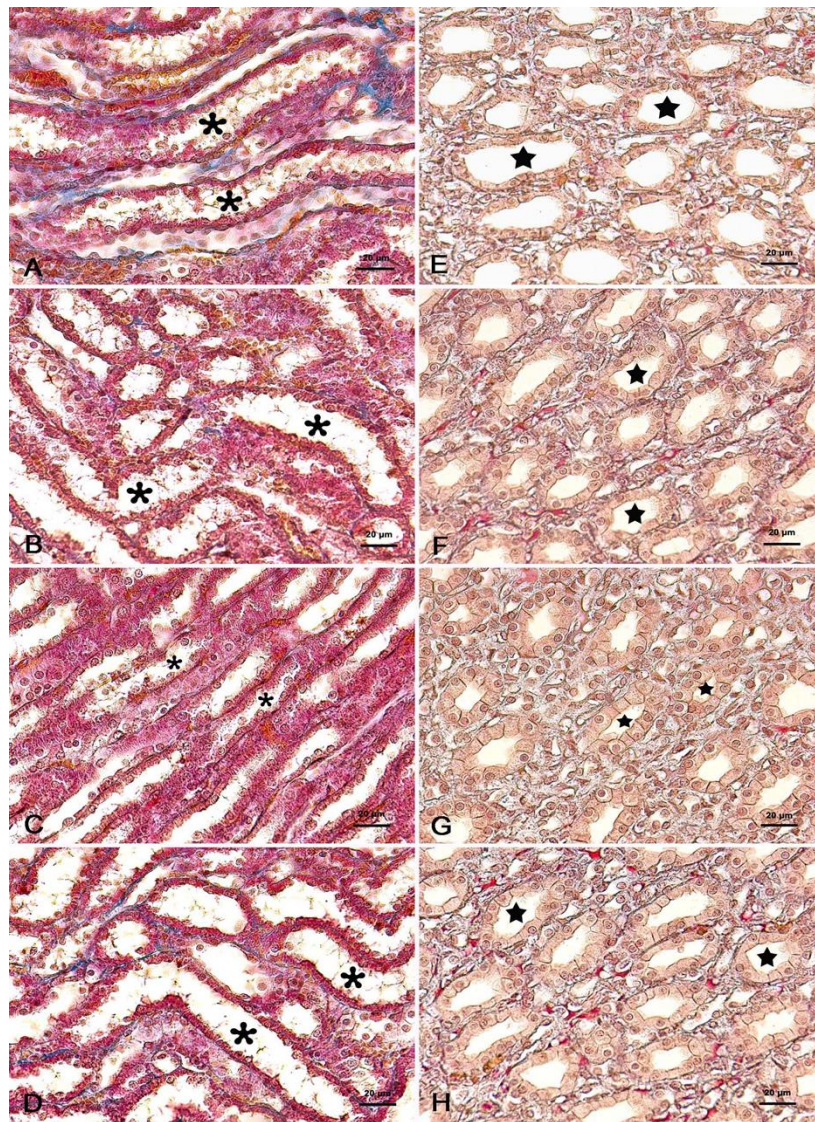
Groups	n	Diameter of renal corpuscle ( $\mu\text{m}$ )	Diameter of proximal tubule ( $\mu\text{m}$ )	Diameter of distal tubule ( $\mu\text{m}$ )	Diameter of ascending limb of Henle's loop ( $\mu\text{m}$ )	Diameter of collecting duct ( $\mu\text{m}$ )
Control	8	93.59 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	34.08 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	26.11 $\pm$ 0.21	32.17 $\pm$ 0.29 <sup>a,b</sup>	33.48 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>
ALA	8	91.67 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	33.80 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	26.14 $\pm$ 0.20	32.09 $\pm$ 0.27 <sup>a,b</sup>	32.67 $\pm$ 0.24 <sup>a,b</sup>
PCB	8	85.45 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup>	32.30 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	26.45 $\pm$ 0.20	29.75 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>	30.27 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>
ALA+P CB	8	93.01 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	34.02 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	26.94 $\pm$ 0.39	31.48 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	31.93 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>
P		***	***	NS	***	***

<sup>a,b,c</sup>: Different superscripts in the same column indicate the significant difference. NS: Non-significant, \*\*\* $p < 0.001$





**Figure 1:** Microscopic appearances of kidney tissues in Control (A), ALA (B), PCB (C) and ALA+PCB (D) groups. It is observed that the diameters of the renal corpuscle (black lines) and proximal tubule (stars) decreased in the PCB group compared to the Control group, and they increased in the ALA+PCB group compared to the PCB group. Crosmon's triple stain method. Bars: 20µm.



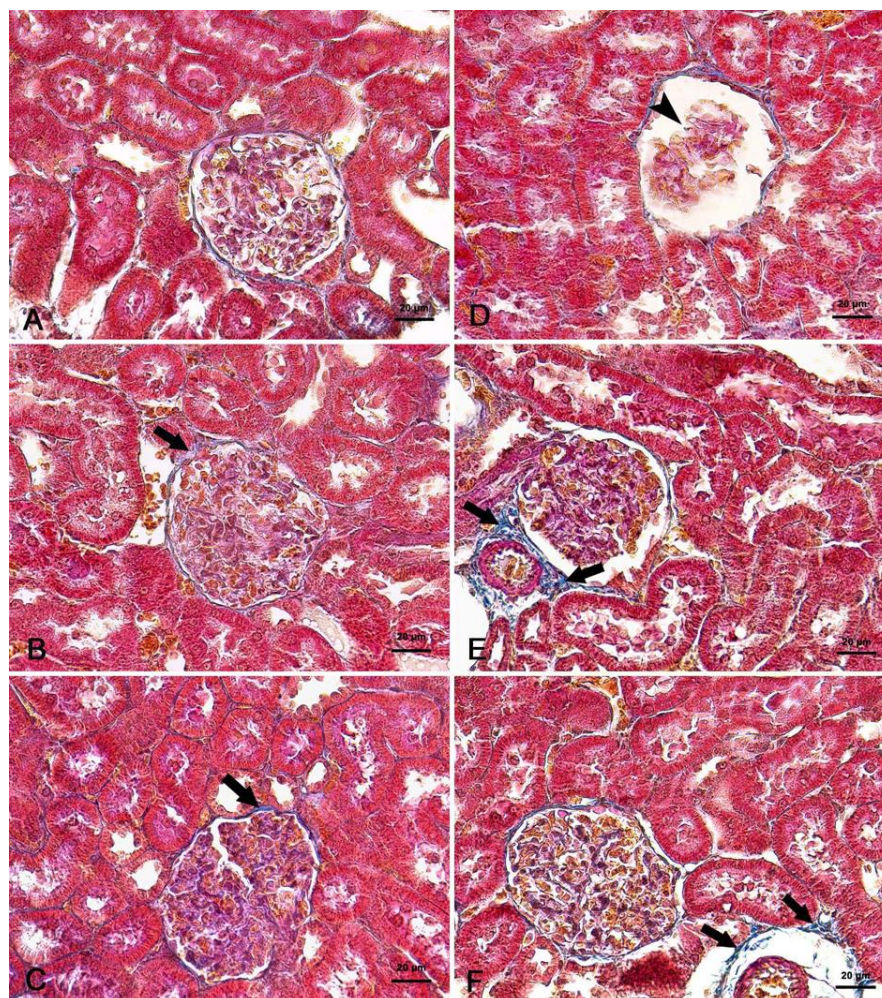
**Figure 2:** Microscopic views of kidney tissues in Control (A, E), ALA (B, F), PCB (C, G) and ALA+PCB (D, H) groups. It is seen that the diameters of the ascending limb of Henle's loop (asterisks) and collecting duct (stars) decreased in the PCB group compared to the Control group and they increased in the ALA+PCB group compared to the PCB group. Crosmon's triple stain method. Bars: 20µm.



**Table 2.** Density values of histopathological changes in kidney tissues of Control and Experimental groups.

Groups	n	Glomerular degeneration	Amount of connective tissue
Control	8	0.10±0.04 <sup>b,c</sup>	0.74±0.04 <sup>b</sup>
ALA	8	0.12±0.05 <sup>b,c</sup>	0.66±0.08 <sup>b</sup>
PCB	8	0.52±0.05 <sup>a</sup>	1.14±0.05 <sup>a</sup>
ALA+PCB	8	0.27±0.03 <sup>b</sup>	1.17±0.05 <sup>a</sup>
P		***	***

<sup>a,b,c</sup>: Different superscripts in the same column indicate the significant difference. \*\*\*p<0.001.



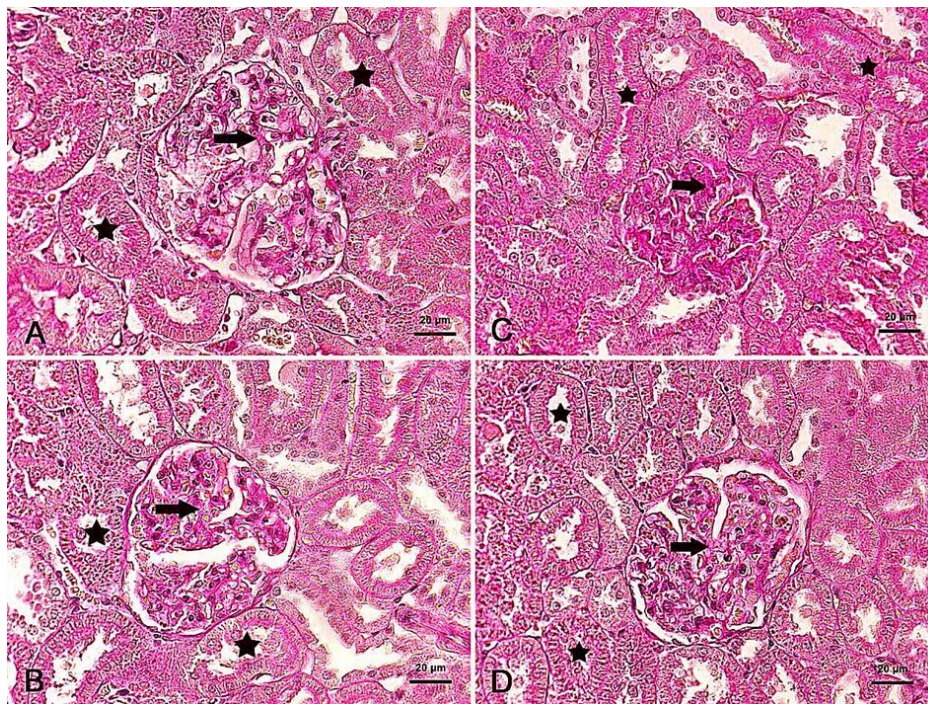
**Figure 3:** Microscopic appearances of kidney tissue sections in Control (A, B), ALA (C), PCB (D, E) and ALA+PCB (F) groups. It is observed that glomerular degeneration (arrowhead) and connective tissue (arrows) densities increased in the PCB group compared to the Control group, while glomerular degeneration decreased in the ALA+PCB group compared to the PCB group. Crosmom's triple staining method. Bars: 20µm.

**Table 3.** Density of glomerular mesangial matrix and glycogen density in proximal tubule epithelium in kidney tissues of Control and Experimental groups.

Groups	n	Density of glomerular mesangial matrix	Glycogen density in proximal tubule epithelium
Control	8	1.62±0.03 <sup>b</sup>	1.53±0.03 <sup>b</sup>
ALA	8	1.74±0.05 <sup>b</sup>	1.61±0.03 <sup>b</sup>
PCB	8	1.86±0.03 <sup>a</sup>	1.78±0.03 <sup>a</sup>
ALA+PCB	8	1.69±0.03 <sup>b</sup>	1.50±0.03 <sup>b</sup>
P		**	***

<sup>a,b</sup>: Different superscripts in the same column indicate the significant difference. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.





**Figure 4:** PAS-positive reaction in kidney tissues of Control (A), ALA (B), PCB (C) and ALA+PCB (D) groups. It is noticed that the PAS-positive reaction densities in the glomerular mesangial matrix (arrows) and proximal tubule epithelium (stars) increased in the PCB group compared to the Control group, and they decreased in the ALA+PCB group compared to the PCB group. Periodic acid-Schiff staining method. Bars: 20µm.

## DISCUSSION

PCB (A1254) is a chemical that leads to environmental pollution and causes corpuscular atrophy in the rat kidney (Kutlu et al. 2007). Atrophy also has been observed in the tubular and glomerular cells in the kidneys of fishes living in PCB-contaminated water (Sula et al. 2020). In the present study, it was determined that the diameters of the renal corpuscle, proximal tubule, ascending limb of Henle's loop and collecting duct decreased in the PCB group compared to the Control group. These results suggest that PCB induces structural changes in the kidney and negatively affects nephron functions. PCB exposure causes disintegration, loss of nuclear material, vacuole formation and necrosis in tubular cells in the mouse kidney (Raja et al. 2019). It has also been reported that edema in renal proximal tubule cells and congestion in the kidney medulla were observed in rats administered PCB (Lu et al. 2009). In the kidneys of fish living in PCB-contaminated water; peritubular fibrosis characterized by inflammation, glomerular necrosis, thickening of the Bowman capsule, hyaline degeneration in the interstitial tissue and fibroblast infiltration have been detected (Sula et al. 2020). On the other hand, it has been determined that faster apoptotic cell death occurred depending on the time when human kidney cells in the culture medium were exposed to PCB (Ghosh et al. 2010). When the histopathological data in our study was examined, it was noted that glomerular degeneration and connective tissue densities increased in the PCB group compared to the Control group. The findings

in our study are similar to the literature, and it can be thought that PCB damages kidney tissue histology and thus it may play a role in the pathogenesis of kidney diseases.

There are very limited data on how PCB affects the PAS reaction in kidney tissue. In the study of Sonne et al. (2008), it was reported that PCB exposure caused PAS-positive glomerular mesangial accumulations and glomerular basement membrane thickening in the fox kidney. Similarly, the present study determined that the PAS-positive reaction densities in the glomerular mesangial matrix and proximal tubule epithelium increased in the PCB group compared to the Control group. Mesangial cell proliferation and increased PAS-positive reaction in the mesangial matrix are associated with glomerulosclerosis (Tomooka et al. 1992). Based on this data; it can be considered that PCBs may contribute to the pathogenesis of glomerulosclerosis and trigger renal dysfunction.

ALA has a strong antioxidant effect which plays a role in protecting cells from the effects of oxidative stress. Studies showed that ALA significantly reduced the rate of glomerulosclerosis, tubulointerstitial fibrosis (Bhatti et al. 2005), tubular dilatation (Oksala et al. 2007), vacuolization, degeneration (Morakinyo et al. 2012), inflammation (Gultekin et al. 2021) and apoptosis in the kidney (Oktan et al. 2021). In addition, it has been demonstrated that ALA widened the narrowed Bowman capsule cavity (Gultekin et al. 2021). In the current study, we found similar

results. The diameters of the renal corpuscle, proximal tubule, ascending limb of Henle's loop and collecting duct, which decreased as a result of PCB exposure, increased with the effect of ALA. Besides, it was observed that glomerular degeneration caused by PCBs was reduced by ALA application. Thus, it was demonstrated for the first time that ALA contributed to the preservation of histological structure in the kidney during PCB exposure. In contrast, ALA didn't affect the connective tissue density increased by PCB in the current study. The study of Wongmekiat et al. (2013) showed that ALA decreased the rate of fibrotic areas formed in the kidney in obstructive nephropathy. The reason for obtaining different results in our study may be due to differences such as the applied experimental model, application duration and application method. On the other hand; in our study, it was determined that the PAS-positive reaction densities which increased in the glomerular mesangial matrix and proximal tubule epithelium in the PCB group, decreased with the effect of ALA. Similarly; in the study by Bhatti et al. (2005), it was shown that the positive PAS reaction in the mesangial matrix in the kidneys of rats with experimental diabetes was alleviated by the effect of ALA. As mentioned above, increased PAS-positive reaction in the mesangial matrix are associated with glomerulosclerosis (Tomooka et al. 1992). Based on this information, ALA application against PCB toxicity may reduce the risk of glomerulosclerosis.

Oxidative stress stimulates the development of processes such as mutation, apoptosis, and aging in the cell and ultimately causes tissue damage (Valko et al. 2006). In the study of Banudevi et al. (2006), PCB exposure reduced the activities of antioxidant enzymes such as SOD, CAT, GPx and GR in kidney tissue. On the contrary, it has been determined that PCB triggered the formation of oxidative stress by significantly increasing lipid peroxidation, hydrogen peroxide and hydroxyl radical levels. Based on these data, it can be stated that the reason for the disorders in the kidney that caused due to PCB exposure in our study may be oxidative stress that was occurred by PCBs in the organism. On the other hand, ALA is a free radical-scavenging antioxidant and protects the organism from oxidative damage (Karaca and Sozbilir 2007). Studies have shown that ALA reduced malondialdehyde (MDA) levels through increased MPO activity in kidney tissue of rats with experimental ischemia reperfusion injury (El-Sawalhi and Raafat 2007) and diabetes (Jamor et al. 2019); while it significantly increased the decreased GPx, CAT and GSH levels. Accordingly, the reason for the improvement in kidney tissue disorders in our study may be that ALA protects cells by suppressing the oxidative stress triggered by PCBs.

## CONCLUSION

In conclusion; PCB may negatively affect renal physiology by causing morphological changes in kidney tissue structure. Additionally, the use of ALA against PCB exposure may contribute to the protection of kidney histology. In addition, the findings obtained in our study were presented for the first time and they will serve as a reference for further studies in the future.

**Conflict of interest:** The author has no conflicts of interest to report.

**Authors' Contributions:** Conceptualization, Methodology, Research, Data curation, Visualization, Writing, Review and Editing were done by Mustafa Yıldız.

**Ethical approval:** This study was carried out at Aydin Adnan Menderes University Experiment Animals Application Center. The study was approved by Aydin Adnan Menderes University Animal Experiments Local Ethics Committee (ADUHADYEK Ref No: 6458310/2021/180).

**Acknowledgement:** I would like to thank Prof. Dr. Ulker Eren and Associate Prof. Ozay Gules for their guidance and support.

**Explanation:** The study was presented as oral at the 9th EUROASIA International Congress on Scientific Research and Recent Trends, Antalya, (2022).

## REFERENCES

- Aydin, M., Canpolat, S., Seyran, A. D., Bulmus, O. & Yilmaz, B. (2007). Poliklorlu bifenillerin sıçan korteks, hipokampus, striatum ve hipotalamus dokusunda katekolaminerjik nörotransmitter düzeylerine etkileri. *Fırat Tıp Dergisi*, 12(2), 88-92. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/firattip/issue/6366/8509>
- Bae, E. H., Lee, J., Ma, S. K., Kim, I. J., Frøkiaer, J., Nielsen, S., Kim, S. Y., & Kim, S. W. (2009). Alpha-lipoic acid prevents cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 24(9), 2692-2700. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp176>
- Banudevi, S., Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Vignesh, C., Aruldas, M. M., & Arunakaran, J. (2006). Role of alpha-tocopherol on antioxidant status in liver, lung, and kidney of PCB exposed male albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44(12), 2040-2046. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.017>
- Bhatti, F., Mankhey, R. W., Asico, L., Quinn, M. T., Welch, W. J., & Maric, C. (2005). Mechanisms of antioxidant and pro-oxidant effects of alpha-lipoic acid in the diabetic and nondiabetic kidney. *Kidney International*, 67(4), 1371-1380. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00214.x>

- Bruner-Tran, K. L., & Osteen, K. G. (2010). Dioxin-like PCBs and endometriosis. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 56(2), 132-146. <https://doi.org/10.3109/19396360903381023>
- Cakir, T., Polat, C., Basturk, A., Gul, M., Aslaner, A., Durgut, H., Sehri, A. O., Aykac, A., Bahar, L., & Sabuncuoglu, M. Z. (2015). The effect of alpha-lipoic acid on rat kidneys in methotrexate-induced oxidative injury. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(11), 2132-2139.
- Carpenter, D. O. (2005). Environmental contaminants and human health: The health effects of persistent toxic substances. *Firat Tip Dergisi*, 10(1), 1-4.
- El-Sawalhi, M. M., & Raafat, M. (2007). Effect of alpha-lipoic acid on oxidative stress status in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion injury. *The Egyptian Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 25(1), 59-76. <https://doi.org/10.4314/ejmb.v25i1.35946>
- Ghosh, S., De, S., Chen, Y., Sutton, D. C., Ayorinde, F. O., & Dutta, S. K. (2010). Polychlorinated biphenyls (PCB-153) and (PCB-77) absorption in human liver (HepG2) and kidney (HK2) cells in vitro: PCB levels and cell death. *Environmental International*, 36(8), 893-900. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.06.010>
- Grdović, N., Rajić, J., Arambašić Jovanović, J., Dinić, S., Tolić, A., Đorđević, M., Đorđević, M., Trifunović, S., Vidaković, M., Uskoković, A., & Mihailović, M. (2021).  $\alpha$ -Lipoic acid increases collagen synthesis and deposition in nondiabetic and diabetic rat kidneys. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 6669352. <https://doi.org/10.1155/2021/6669352>
- Guimaraes, S. B., Santos, J. M. V., Aragao, A. A., Kimura, O. D. S., Barbosa, P. H. U., & Vasconcelos, P. R. L. (2007). Protective effect of  $\alpha$ -lipoic acid in experimental spermatic cord torsion. *Nutrition*, 23(1), 76-80. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.09.005>
- Gules, O., Dogan, G., Ercins, U. H., & Eren, U. (2022). Effects of quercetin against doxorubicin-induced testicular toxicity in male rats. *Biological Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 49, 203-213. <https://doi.org/10.1134/S1062359022030086>
- Gules, O., & Eren, U. (2016). Protective role of alpha lipoic acid against polychlorobiphenyl (Aroclor 1254)-induced testicular toxicity in rats. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 57(2), 451-459.
- Gultekin, B., Tuncer, S., & Burat, I. (2021). Protective effects of alpha lipoic acid on ischemia-reperfusion induced kidney damage. *Journal of Medical Sciences and Health*, 7(3), 51-58. <https://doi.org/10.46347/jmsh.2021.v07i03.011>
- Hsu, P. C., Pan, M. H., Li, L. A., Chen, C. J., Tsai, S. S., & Guo, Y. L. (2007). Exposure in utero to 2,2',3,3',4,6'-hexachlorobiphenyl (PCB 132) impairs sperm function and alters testicular apoptosis related gene expression in rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221(1), 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.01.027>
- Jamor, P., Ahmadvand, H., Ashoory, H., & Babaeenezhad, E. (2019). Effect of alpha-lipoic acid on antioxidant gene expression and kidney injury in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Nephropathology*, 8(1), e06. <https://doi.org/10.15171/jnp.2019.06>
- Karaca, E. G., & Sozibilir, N. B. (2007). Dietilnitrozamin verilen ratlarda alfa lipoik asidin koruyucu etkilerinin araştırılması. *Medical Journal of Kocatepe*, 7, 11-17. <https://doi.org/10.18229/ktd.47416>
- Kutlu, S., Colakoglu, N., Halifeoglu, I., Sandal, S., Seyran, A. D., Aydin, M., & Yilmaz, B. (2007). Comparative evaluation of hepatotoxic and nephrotoxic effects of aroclors 1221 and 1254 in female rats. *Cell Biochemistry and Function*, 25(2), 167-172. <https://doi.org/10.1002/cbf.1289>
- Lilienthal, H., Fastabend, A., & Hany, J. (2000). Reduced levels of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in rat dams and offspring after exposure to a reconstituted PCB mixture. *Toxicological Sciences*, 57(2), 292-301. <https://doi.org/10.1093/toxsci/57.2.292>
- Lindell, B. (2012). Polychlorinated biphenyls (PCBs). *Environmental Medicine at Sahlgrenska Academy*, 46(1).
- Lu, C. F., Wang, Y. M., Peng, S. Q., Zou, L. B., Tan, D. H., Liu, G., Fu, Z., Wang, Q. X., & Zhao, J. (2009). Combined effects of repeated administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and polychlorinated biphenyls on kidneys of male rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(4), 767-776. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9323-x>
- Mervaala, E., Finckenberg, P., Lapatto, R., Müller, D. N., Park, J. K., Dechend, R., Ganten, D., Vapaatalo, H., & Luft, F. C. (2003). Lipoic acid supplementation prevents angiotensin II-induced renal injury. *Kidney International*, 64(2), 501-508. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00108.x>
- Morakinyo, A. O., Oludare, G. O., Anifowose, A. A., & Adegoke, O. A. (2012). Protective effects of alpha lipoic acid on carbon tetrachloride-induced liver and kidney damage in rats. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 3(1), 21-28.
- Murugesan, P., Balaganesh, M., Balasubramanian, K., & Arukaran, J. (2007). Effects of polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) on steroidogenesis and antioxidant system in cultured adult rat Leydig cells. *Journal of Endocrinology*, 192(2), 325-338. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06874>
- Oksala, N. K., Lappalainen, J., Laaksonen, D. E., Khanna, S., Kaarniranta, K., Sen, C. K., & Atalay, M. (2007). Alpha-lipoic Acid modulates heat shock factor-1 expression in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(4), 497-506. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.1450>
- Oktan, M. A., Heybeli, C., Ural, C., Kocak, A., Bilici, G., Cavdar, Z., Ozbal, S., Arslan, S., Yilmaz, O., & Cavdar, C. (2021). Alpha-lipoic acid alleviates colistin nephrotoxicity in rats. *Human & Experimental Toxicology*, 40(5), 761-771. <https://doi.org/10.1177/0960327120966043>
- Oskam, I. C., Ropstad, E., Smith, A. J., Skaare, J. U., Tverdal, A., Berg, K. A., & Viger, R. (2004). Effects of PCB 99 and PCB 153 exposure on spermatogenesis in young adult C57BL6 mice. *Reproductive Toxicology*, 19(2), 169-180. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.07.005>
- Padmalayam, I., Hasham, S., Saxena, U., & Pillarisetti, S. (2009). Lipoic acid synthase (LAS) a novel role in inflammation, mitochondrial function, and insulin resistance. *Diabetes Journals*, 58(3), 600-608. <https://doi.org/10.2337/db08-0473>
- Pradhan, S., Mandal, S., Roy, S., Mandal, A., Das, K., & Nandi, D. K. (2013). Attenuation of uremia by orally feeding alpha-lipoic acid on acetaminophen induced uremic rats. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 187-192. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.03.003>

- Raja, J., Pathak, S., & Kundu, R. (2019).** Low dose and subchronic Aroclor 1254 induced histopathological changes in mice kidney. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 7(03), 59-62. <https://doi.org/10.7324/JABB.2019.70311>
- Seyran, A., & Erisir, M. (2008).** Poliklorlu bifeniller ve sağlık üzerine etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 22(1), 33-40.
- Singh, U., & Jialal, I. (2008).** Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutrition Reviews*, 66(11), 646-657. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00118.x>
- Sirca, T., Onder, A., Kapan, M., Tekin, R., Firat, U., Evliyaoglu, O., & Taskesen, F. (2012).** Ratlarda oluşturulan deneysel ince bağırsak obstruksiyonlarında splenektominin bakteriyel translokasyon ve inflamatuvar değişikliklere etkisi. *Turkish Journal of Surgery*, 28, 001-007. <https://doi.org/10.5097/1300-0705.UCD.1400-12.05>
- Sonne, C., Wolkers, H., Leifsson, P. S., Jenssen, B. M., Fuglei, E., Ahlström, O., Dietz, R., Kirkegaard, M., Muir, D. C., & Jørgensen, E. (2008).** Organochlorine-induced histopathology in kidney and liver tissue from Arctic fox (*Vulpes lagopus*). *Chemosphere*, 71(7), 1214-1224.
- Sula, E., Aliko, V., Marku, E., Nuro, A., & Faggio, C. (2020).** Evaluation of kidney histopathological alterations in Crucian Carp, *Carassius carassius*, from a pesticide and PCB-contaminated freshwater ecosystem, using light microscopy and organ index mathematical model. *International Journal of Aquatic Biology*, 8(3), 154-165.
- Tomooka, S., Border, W. A., Marshall, B. C., & Noble, N. A. (1992).** Glomerular matrix accumulation is linked to inhibition of the plasmin protease system. *Kidney International*, 42, 1462-1469. <https://doi.org/10.1038/ki.1992.442>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncola, J., Izakovic, M., & Mazura, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Winiarska, K., Malinska, D., Szymanski, K., Dudziak, M., & Bryła, J. (2008).** Lipoic acid ameliorates oxidative stress and renal injury in alloxan diabetic rabbits. *Biochimie*, 90(3), 450-459. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.11.010>
- Wongmekiat, O., Leelarungrayub, D., & Thamprasert, K. (2013).** Alpha-lipoic acid attenuates renal injury in rats with obstructive nephropathy. *BioMed Research International*, 2013, 138719. <https://doi.org/10.1155/2013/138719>

## A Study on Ectoparasites of the Some Wild Mammals (Mammalia) and Reptiles (Reptilia) in Türkiye

Bilal DİK<sup>1</sup>, Emine Hesna KANDIR<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University, Konya, Türkiye

<sup>2</sup>Department of Wild Animal Diseases and Ecology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarabısar, Türkiye

### ABSTRACT

This study was performed in AKUREM (Afyon Kocatepe University Wildlife Rescue Rehabilitation Training Practise and Research Centre) within Afyon Kocatepe University, in Türkiye between 2017-2022. In this period, 29 injured wild mammals belonging to the 11 species, and 11 individuals belonging to a reptile species (*Testudo graeca*), a total of 40 animals were visually examined for ectoparasites. At least one ectoparasite species was detected in 39 of the examined animals, and 423 ectoparasites were collected from the infested animals. It has been observed that infested animals were infested with 1-5 ectoparasite species. Of the 39 infested animals, 32 had ixodid ticks, eight had fleas, four had fly larvae, and three had Hippoboscid flies. In this study, nine ixodid tick species (*Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis erinacei*, *Ha. parva*, *Hyalomma aegyptium*, *Hy. marginatum marginatum*, *Hy. scupense*, *Ixodes* spp, *Rhipicephalus bursa*, *R. turanicus*); five flea species (*Archaeopsylla erinacei erinacei*, *Chaetopsylla globiceps*, *Ctenocephalides canis*, *Ct. felis felis*, *Pulex irritans*); adults of two fly species (*Hippobosca equina*, *Pseudolynchia canariensis*); and larvae of two fly species (*Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*) were detected. Seven ectoparasite species, four tick and three flea species, were found in red foxes. Six ectoparasite species were detected in red deer and feral horses. The infested animals had 1-80 ectoparasites. Mean intensity was 11.43 (excluding fly larvae).

**Keywords:** Anatolian wild sheep, *Ctenocephalides felis felis*, *Hyalomma aegyptium*, *Rhipicephalus turanicus*, Red deer, *Lynx lynx*.

\*\*\*

### Türkiye'deki Bazı Yabani Memeli (Mammalia) ve Sürüngenlerde (Reptilia) Görülen Ektoparazitler Üzerine Bir Çalışma ÖZ

Bu araştırma 2017-2022 tarihleri arasında AKÜREM (Afyon Kocatepe Üniversitesi Yaban Hayatı Kurtarma, Rehabilitasyon, Eğitim, Uygulama ve Araştırma Merkezi)'de yapılmıştır. Bu tarihler arasında merkeze getirilen 11 türe ait 29 yabani memeli hayvan ile bir sürüngen (Kaplumbağa; *Testudo graeca*) türüne ait 11, toplam 40 hayvan dış parazit yönünden makroskopik olarak muayene edilmiştir. İncelenen hayvanların 39'unda en az bir ektoparazit türü tespit edilmiş ve enfeste hayvanlardan 423 adet ektoparazit toplanmıştır. Enfeste hayvanların 1-5 ektoparazit türüyle enfeste olduğu gözlenmiştir. Enfeste bulunan 39 hayvanın 32'sinde ixodid kene, sekizinde pire, dördünde sinek larvaları, üçünde ise Hippoboscid sinek saptanmıştır. Bu çalışmada dokuz kene türü: *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis erinacei*, *Ha. parva*, *Hyalomma aegyptium*, *Hy. marginatum marginatum*, *Hy. scupense*, *Ixodes* spp, *Rhipicephalus bursa*, *R. turanicus*; beş pire türü: *Archaeopsylla erinacei erinacei*, *Chaetopsylla globiceps*, *Ctenocephalides canis*, *Ct. felis felis*, *Pulex irritans*; iki sinek türünün (*Hippobosca equina*, *Pseudolynchia canariensis*) erginine ve iki sinek türünün de (*Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*) larvalarına (myiasis) rastlanmıştır. Kızıl tilkilerde dört kene ve üç pire türü olmak üzere yedi ektoparazit türü saptanmıştır. Kızıl geyik ve yıldı atlarında ise altı ektoparazit türü tespit edilmiştir. Enfeste bireylerdeki ektoparazit adedi 1-80 arası değişmiştir. Ortalama ektoparazit yoğunluğu 11.43 olarak hesaplanmıştır (sinek larvaları hariç).

**Anahtar Kelimeler:** Anadolu yaban koyunu, *Ctenocephalides felis felis*, *Hyalomma aegyptium*, *Rhipicephalus turanicus*, Kızıl geyik, Vaşak

To cite this article: (Dik B, Kandir EH) A Study on Ectoparasites of the Some Wild Mammals (Mammalia) and Reptiles (Reptilia) in Türkiye  
Kocatepe Vet J. (2023):16(4):513-520

Submission: 21.09.2023 Accepted: 29.11.2023 Published Online: 05.12.2023

ORCID ID; BD: 0000-0002-7553-5611, EHK: 0000-0002-2712-6792.

\*Corresponding author e-mail: eminehesnakandir@gmail.com



## GİRİŞ

Türkiye’de yaklaşık 170 memeli ve 120 sürüngen türü bulunmaktadır (Şekercioğlu ve ark. 2011). Habitatlarının daralması, ateşli silahla yaralanmalar, araç kazaları, elektrik şokları ve zehirlenmelere bağlı olarak birçok yaban hayvanının nesilleri tehdit altındadır. Yabani memeli hayvanlar ve sürüngenler, yaşam şartlarına bağlı olarak, kontrol altında bulunanlar dışında, hastalıklar yönünden muayene ve tedavi edilememektedir. Buna bağlı olarak, bu hayvanlar birçok ektoparazit veya hastalığın evcil ve yabani hayvanlara, ya da insanlara bulaştırılmasında rol oynamaktadır (Kočišová ve ark. 2006; Santos-Silva ve ark. 2011; Domínguez-Peñañiel ve ark. 2011; Estrada-Pena 2015; Dik 2020; Dik ve ark. 2020).

Yapılan araştırmalarda (Dominguez 2003; Ruiz-Fons ve ark. 2006; Galloway 2011; Santos-Silva ve ark. 2011) yabani memelilerde ixodid kene, pire, bit ve akarlar oldukça sık rastlanmaktadır.

Yaban hayvanlarının elde edilebilmesinin ve/veya araştırma yapabilmenin güçlükleri nedeniyle Türkiye yabani memelilerin ve sürüngenlerinin dış parazit faunası yeterince bilinmemektedir (Dik 2020, Dik ve ark. 2012; Goz ve ark. 2016; Keskin ve ark. 2018, 2019). Gerçi yılkı atlarının (Dik ve ark. 2020), bozayların (Dik ve Oruç-Kılıç 2015), yabani tavşanların (Aksın ve Aksın 2002, Dik ve Uslu 2007, 2008, 2018); tilkilerin (Aydın ve ark. 2011, Dinçer 1971; Eren ve ark. 2021), yer sincaplarının (Uslu ve ark. 2008), karacaların (Açııcı ve ark. 2012), domuzların (Girişgin ve ark. 2009), karpınların (Girişgin ve ark. 2015), kemirgenlerin (Açııcı ve ark. 2017; Dik ve ark. 2019, Keskin ve ark. 2017, Porsukların (Taşçı ve ark. 2017; Umur ve ark. 2019), sansarların (Keskin ve Dik 2023) ve sürüngenlerin (Aydın ve ark. 2002; Aysul ve ark. 2010; Bakırcı 2016) dış parazitleri üzerine bazı çalışmalar yapılmış ve genellikle az sayılarda materyal incelenmiştir.

Bu araştırma aslında Afyon Kocatepe Üniversitesi Yaban Hayatı Kurtarma, Rehabilitasyon, Eğitim, Uygulama ve Araştırma Merkezi (AKÜREM’e getirilen yabani memelilerdeki ektoparazitlerin belirlenmesi amacıyla planlanmış, fakat AKÜREM’e çok sayıda Kara kaplumbağasının getirilmesi nedeniyle, onlar da araştırmaya dahil edilmiştir.

## MATERYAL ve METOT

Bu çalışma Ocak 2017 - Ağustos 2022 tarihleri arasında Eskişehir, Kütahya, Uşak ve Denizli illerinden tedavi amacıyla AKÜREM’e getirilen 11 türe ait 29 yabani memeli hayvan ile 11 Kara kaplumbağası (*Testudo graeca*) üzerinde yapılmıştır (Tablo 1). Yaralı olarak getirilen yabani memeliler ve kaplumbağalar o birimde gönüllü olarak çalışan ve bu konuda eğitilen Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğrencileri

tarafından makroskobik olarak dış parazit yönünden muayene edilmiş ve tespit edilen parazitler pensle toplanarak, içinde %70 alkol bulunan tüplere alınmıştır. Tüplerin üzerlerine hayvanın türü, bulunduğu yerin adı ve tarihini belirten etiketler yapıştırılmış, ayrıca bütün veriler bilgisayara kaydedilmiştir.

Toplanan ektoparazitler Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarında, Nikon SMZ745T trinoküler stereo mikroskopta incelenmiştir. Kenelerin teşhislerinde Karaer ve ark. 1997; Apanaskevich ve Horak 2008; Apanaskevich ve ark. 2009; Estrada-Pena ve ark. 2017, Hippoboscid sineklerin erginlerinin teşhislerinde ise Maa 1969 ve Hutson 1984’den yararlanılmıştır. Nimf dönemindeki keneler cins seviyesinde teşhis edilebilmiştir. Pireler ve myiasis olgularında, sinek larvaları %70 alkolden %10 KOH solüsyonuna aktarılmış ve örnekler saydamlaşmaya kadar 24 - 72 saat bekletilmiştir. KOH solüsyonundan alınan örnekler birkaç saat süreyle distile suda bekletildikten sonra, birkaç saat süreyle ve sırasıyla %70 - %99’luk alkol serilerinden geçirilmiş, daha sonra kısa bir süre alkol fenolde tutulmuş ve Kanada balsamla lam üzerine yapıştırılmıştır. Hazırlanan preparatlar üç hafta süreyle etüvde, 55 °C’de bekletilerek kurutulmuş ve Leica DM750 trinoküler ışık mikroskobunda incelenerek teşhis edilmiştir. Pirelerin teşhislerinde Dinçer 1971, Beaucournu ve Launay 1990’dan, sinek larvalarının teşhislerinde ise Zumpt 1965; Szpila 2010 ve Thyssen 2010’dan yararlanılmıştır.

## BULGULAR

Bu araştırmada incelenen hayvan türleri ile tespit edilen ektoparazit türleri Tablo 1’de gösterilmiştir. Bu tablodan da anlaşılacağı üzere, ektoparazitlerle enfeste 40 hayvanın 39’unda en az bir ektoparazit türü saptanmış, öğrenciler tarafından yapılan ilk inceleme sonucu enfeste olduğu düşünülen bir Kızıl Tilki’den alınan örneğin ise parazit olmadığı gözlenmiştir.

İncelenen 29 memeli hayvanın 24 (%82.76)’ünde ixodid kene, sekizinde (%27.59) pire, dördünde (%13.79) Diptera larvası, üçünde (%10.34) ise Hippoboscid sinek saptanmıştır. Kara kaplumbağalarının sekizinde kene, üçünde ise *Calliphora* ve *Lucilia* larvalarından kaynaklanan myiasis tespit edilmiştir.

Enfeste hayvanlardan dokuz türe [(*Dermacentor marginatus* (Sulzer) (1♀), *Haemaphysalis erinacei* (Pavesi) (32♂ 7♀ 1N), *Haemaphysalis parva* (Neumann) (8♂), *Hyalomma aegyptium* (Linnaeus) (97♂ 36♀ 26N), *Hyalomma marginatum marginatum* Koch (29♂ 4♀), *Hyalomma scupense* Schulze (= *Hy. detritum*) (1♂), *Ixodes* spp (1N), *Rhipicephalus bursa* Canestrini and Fanzago, (1♂ 1♀), *Rhipicephalus turanicus* Pomerantzev (6♂ 6♀), *Hyalomma* spp (4N)] ait toplam 261 adet (174♂ 55♀

32N) ixodid kene; beş pire türüne [(*Archaeopsylla erinacei* *erinacei* Bouché (20♂ 27♀), *Chaetopsylla globiceps* (Taschenberg) (4♂ 3♀), *Ctenocephalides canis* (Curtis) (2♂ 3♀), *Ctenocephalides felis felis* (Bouché) (4♂ 13♀), *Pulex irritans* Linnaeus (12♂ 19♀)] ait toplam 107 adet (42♂ 65♀) pire ve iki Hippoboscid türünün [(*Hippobosca equina* Linnaeus (3♂ 4♀), *Pseudolynchia*

*canariensis* (Macquart) (1♂ 3♀)] erginlerine ait 11 sinek olmak üzere, toplam 379 ektoparazit toplanmıştır. İki olguda ise Calliphorid sinek türünün (*Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, *Lucilia sericata* Meigen) larvaları tespit edilmiş, fakat toplanan larvalar sayılmadığı için bu rakama dahil edilmemiştir.

**Tablo 1.** İncelenen yabani hayvan türleri ve saptanan ektoparazit türleri  
**Table 1.** Examined wild animal species and detected ectoparasite species

No	İncelenen Hayvan Türü (n)	Tespit edilen ektoparazit türü
1.	Kızıl Tilki ( <i>Vulpes vulpes</i> ) (8)	<i>Chaetopsylla globiceps</i> 3♀, 4♂ <i>Ctenocephalides canis</i> 3♀, 2♂ <i>Pulex irritans</i> 16♀, 8♂ <i>Haemaphysalis parva</i> 6♂ <i>Haemaphysalis erinacei</i> 6♀, 14♂ <i>Hyalomma marginatum</i> 1♀, 7♂ <i>Rhipicephalus turanicus</i> 1♀
2.	Kızıl Geyik ( <i>Cervus elaphus</i> ) (8)	<i>Dermacentor marginatus</i> 1♀ <i>Haemaphysalis parva</i> 2♂ <i>Hyalomma marginatum</i> 4♂ <i>Rhipicephalus turanicus</i> 2♀, 1♂ <i>Hippobosca equina</i> 2♀, 1♂ <i>Pseudolynchia canariensis</i> 2♀
3.	Vaşak ( <i>Lynx lynx</i> ) (2)	<i>Ctenocephalides felis felis</i> 13♀, 4♂ <i>Haemaphysalis erinacei</i> 18♂, 1N <i>Pseudolynchia canariensis</i> 2♀ <i>Hippobosca equina</i> 1♀
4.	Kurt ( <i>Canis lupus</i> ) (2)	<i>Pulex irritans</i> 4♀, 3♂ <i>Lucilia sericata</i> (1 adet L3)
5.	At ( <i>Equus ferus caballus</i> ) (2)	<i>Haemaphysalis erinacei</i> 1♀ <i>Hyalomma marginatum</i> 3♀, 18♂ <i>Hyalomma scupense</i> 1♂ <i>Rhipicephalus bursa</i> 1♀, 1♂ <i>Rhipicephalus turanicus</i> 2♀ <i>Hippobosca equina</i> 1♀, 2♂
6.	Porsuk ( <i>Meles meles</i> ) (1)	<i>Ixodes</i> spp. 1N
7.	Kirpi ( <i>Erinaceus concolor</i> ) (2)	<i>Archaeopsylla erinacei erinacei</i> 27♀, 20♂ 9 adet sinek larvası (L2)
8.	Sincap ( <i>Sciurus vulgaris</i> ) (1)	<i>Hyalomma</i> spp. 1N
9.	Anadolu yaban Koyunu ( <i>Ovis gmelini anatolica</i> ) (1)	<i>Rhipicephalus turanicus</i> 1♂
10.	Karaca ( <i>Capreolus capreolus</i> ) (1)	<i>Rhipicephalus turanicus</i> 1♀, 4♂
11.	Tavşan ( <i>Lepus europaeus</i> ) (1)	<i>Hyalomma</i> spp 6 nimf
12.	Kara Kaplumbağası ( <i>Testudo graeca</i> ) (11)	<i>Hyalomma aegyptium</i> 36♀, 97♂, 26N <i>Calliphora vicina</i> (çok sayıda L2, L3) <i>Lucilia sericata</i> (çok sayıda L2, L3) Teşhis edilemeyen sinek larvası 34 adet

Enfeste hayvanların bir veya birden fazla türle enfeste olduğu gözlenmiş, 32'sinde kene, sekizinde pire, dördünde sinek larvası (miyaz olgusu) ve üçünde de Hippoboscid sineklere rastlanmıştır. Enfeste

bireylerde saptanan ektoparazit türü 1-5, toplanan ektoparazit adedi 1-80 (çok sayıda larvanın olduğu miyaz olgularında larva sayımı yapılmamıştır) arasında değişmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde, en fazla

ektoparazit türüne (yedi tür) Kızıl tilki, altı tür ile Kızıl geyik ve yulduz atlarında rastlanmıştır. Kızıl tilkilerde dört kene ve üç pire türüne rastlanırken, Kızıl geyiklerde dört kene ve iki hippoboscid sinek, atlarda ise beş kene türü ve *Hip. equina* tespit edilmiştir. Myiasis enfeste bir kara kaplumbağası ile bir kirpiden toplanan ikinci

döneme ait olup, üçüncü döneme geçmek üzere olan sinek larvaları cins ve tür seviyesinde teşhis edilememiştir. Enfeste hayvanların kaç tür ektoparazit enfeste oldukları Tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** İncelenen hayvanların ektoparazitlerle enfestasyon durumları  
**Table 2.** Infestation status of examined animals with ectoparasites

Enfestasyon tipi	Artropod türü	Enfeste hayvan adedi (n)
<b>Enfeste olmayan (1)</b>	-	1
<b>Tek türle enfestasyon (27)</b>	<i>A. erinacei erinacei</i>	1
	<i>D. marginatus</i>	1
	<i>Hae. erinacei</i>	1
	<i>Hyalomma</i> spp.	2
	<i>Hy. aegyptium</i>	9
	<i>Hy. marginatum</i>	2
	<i>Ixodes</i> spp.	1
	<i>Lucilia</i> spp.	1
	<i>P. irritans</i>	2
	<i>Rh. turanicus</i>	5
	Teşhis edilemeyen sinek larvası (L2)	2
<b>İki türle enfestasyon (8)</b>	<i>Hae. erinacei+Ch. globiceps</i>	1
	<i>Hae. erinacei+Ct. felis felis</i>	1
	<i>Hae. erinacei+P. irritans</i>	1
	<i>Hae. erinacei+Rh. turanicus</i>	1
	<i>Hae. parva+Rh. turanicus</i>	1
	<i>Hy. m. marginatum+Ixodes</i> spp.	1
	<i>Rh. turanicus+P. irritans</i>	1
	<i>C. vicina+L. sericata</i>	1
<b>Üç türle enfestasyon (2)</b>	<i>Hip. equina+Hy. m. marginatum+P. canariensis</i>	1
	<i>Hippobosca</i> spp.+ <i>Hae. erinacei+P. canariensis</i>	1
<b>Beş türle enfestasyon (2)</b>	<i>Hae. parva+Hae. erinacei+Ch. globiceps+Ct. canis+P. irritans</i>	1
	<i>Hip. equina+Hy. m. marginatum+Hy. scupense+Rh. bursa+Rh. Turanicus</i>	1
<b>Toplam</b>		<b>40</b>

Bu tablodan da anlaşılacağı üzere incelenen hayvanların çoğunluğunun (27 olgu) tek türle, sekizinin iki, ikisinin üç, ikisinin ise beş ektoparazit türü ile enfeste olduğu belirlenmiştir. İncelenen 11 kara kaplumbağasının tamamı bir tür ektoparazit ile enfeste bulunmuştur.

## TARTIŞMA

Türkiye’de, yaban hayvanına ulaşmanın veya çalışma yapmanın zorlukları nedeniyle ektoparazitler üzerine yapılan araştırmalar genellikle ya bir hayvan türünün ya da sınırlı sayıda birkaç hayvan türünün az sayıda örnekleri üzerinde yapılmıştır (Dinçer 1971; Aksın ve Aksın 2002; Aydın ve ark. 2002; Dik ve Uslu 2007, 2008, 2018; Uslu ve Dik 2008; Girişgin ve ark. 2009, 2015, 2018; Aysul ve ark. 2010; Aydın ve ark. 2011; Açıcı ve ark. 2012, 2017; Eren ve ark. 2012; Yılmaz ve ark. 2013; Bakırcı 2016; Goz ve ark. 2016; Keskin ve ark. 2017, 2019; Taşcı ve ark. 2017; Dik ve ark. 2019, 2020; Umur ve ark. 2019; Dik 2020). O araştırmalarda, incelenen hayvanlardan genellikle kene ve pire kayıtları yapılmış; bit, akar ve diğer ektoparazitler ya hiç çalışılmamış, ya sınırlı çalışılmış ya da onlara rastlanmamıştır.

Dominguez (2003) İspanya’da incelediği 17 türe ait 103 yabani memeliden %60’ında kene, %51.4’ünde pire, %3.8’inde bit ve %3.8’inde de akar veya Hippoboscid sinek tespit etmiştir. Bu araştırmada incelenen 29 memeli hayvanın 24’ünde (%82.76) ixodid kene, sekizinde (%27.59) pire, dördünde (%13.79) Diptera larvası, üçünde (%10.34) ise Hippoboscid sinek saptanmış, akar tespit edilememiştir. Elde edilen verilerin Dominguez (2003)’in bulgularıyla aynı paralelde olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, muhtemelen incelenen hayvan türü ve örneğinin daha az sayıda ve/veya bu ektoparazitlerin daha küçük olmalarından, muhtemelen incelemeyi yapan öğrencilerin gözünden kaçmış olmasından dolayı, bu çalışmada bit ve akar saptanamamıştır.

Yabani memelilerde genellikle kenelere daha çok rastlanmaktadır. İspanya’da Kızıl geyik ve domuzların keneleri üzerine yapılan bir çalışmada, Kızıl geyiklerde 10 ixodid kene türü saptanmış, en yaygın türlerin *Hy. marginatum marginatum*, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Say) ve *Rb. bursa* olduğu belirtilmiştir (Ruiz-Fons ve ark 2006). Türkiye’de, Erzurum’da incelenen Kızıl tilkilerde iki kene türü: *Ixodes hexagonus* Leach ve *Haemaphysalis numidiana* Neumann saptanmıştır (Aydın ve ark 2011). Açıcı ve ark (2012) inceledikleri 17 Karacada *Haemaphysalis concinna* (Koch), *Ha. punctata* (Canestrini ve Fanzago), *I. ricinus*, *Rb. bursa* ve *Rb. turanicus* türlerine rastlamışlardır. Girişgin ve ark (2015) kirpilerde yaptıkları çalışmada *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, *Hy. aegyptium* ve *Hae. parva* tespit etmişler, diğer bir çalışmalarında ise (Girişgin ve ark 2018) Boz Ayı (*Ursus arctos*)’da *Hae. erinacei*, Aslan (*Panthera leo*), Kaplan (*Panthera tigris*), Çizgili Sırtlan (*Hyaena hyaena*)’da

ise *Rb. sanguineus* tespit etmişlerdir. Keskin ve ark (2018) çoğunluğunu kemirici hayvanların oluşturduğu 10 türe ait 19 yabani memeli hayvan incelemişler, Kızıl tilkilerde *Rb. turanicus*’a, Yabani tavşanlarda (*L. europaeus*) *Rb. bursa* ve *Hyalomma* spp (nimf) örneklerine rastlamışlardır. Konya yöresindeki Yaban tavşanlarının ektoparazitleri üzerine yapılan başka bir çalışmada, akar türlerinden *Cheyletiella parasitivorax* (Mégnin), *Dermanyssus gallinae* (De Geer) ve *Neotrombicula* (N.) *autumnalis* (Shaw)’ın yanı sıra, *Dermacentor* spp (N), *Hae. parva*, *Haemaphysalis* spp (N), *Ixodes* spp (N) ve *Rhipicephalus* spp (N) saptanmıştır (Dik ve Uslu 2018). Başka bir çalışmada ise, Avrasya porsuğundan (*Meles meles*) *I. ricinus* ve *Rb. sanguineus* bildirilmiştir (Umur ve ark. 2019). Bu araştırmada Dik ve Uslu (2018)’nun yaban tavşanlarında saptadıkları akar türlerine rastlanmamakla birlikte; *Hyalomma* cinsine ait üç, *Haemaphysalis* ve *Rhipicephalus* cinslerine ait ikişer, *Dermacentor* ve *Ixodes* cinslerine ait birer tür olmak üzere dokuz kene türü tespit edilmiş, *Ixodes* cinsindeki örnek nimf döneminde olduğu için tür teşhisi yapılamamıştır. Bu araştırmada *Rb. turanicus*’un en yaygın kene türü olduğu gözlenmiş ve daha önce Türkiye’deki yabani memelilerden kaydedilmeyen bu kene türüne Kızıl geyik, Kızıl tilki, Yaban atı, Anadolu yaban koyunu ve Karacada rastlanmış, Kızıl geyiklerde en yaygın kene türünün *Rb. turanicus* olduğu saptanmıştır. *Rb. turanicus*’u üçer farklı konakta saptanan *Ha. erinacei* ile iki farklı konakta tespit edilen *Hy. marginatum marginatum* takip etmiş, diğer türler ise sadece birer konakta gözlenmiştir. Bu araştırmada, Kızıl tilkilerde *Hae. parva*, *Hae. erinacei* ve *Rb. turanicus* tespit edilmiş, Aydın ve ark. (2011) tarafından kaydedilen *I. hexagonus* ve *Hae. numidiana*’ya rastlanmamıştır. Diğer taraftan Girişgin ve ark (2018) tarafından Boz ayıda saptanan *Hae. erinacei*’ye bu araştırmada Kızıl tilki, Yaban atı ve Vaşakta rastlanmış; Aslan, Kaplan, Çizgili Sırtlanda saptanan *Rb. sanguineus*’a ise bu araştırmada rastlanmamıştır.

Pireler geçici ve kozmopolit artropodlar olup, sadece ergin dönemlerinde konaklarından kan emerler, konak seçmezler ve farklı konaklardan kan emebilirler. Türkiye’de 36 cinsle ait 115 pire tür veya alt türü (83 tür, 32 alt tür) tespit edilmiştir (Keskin ve ark. 2018). Merdivenci (1965) tilkilerde, *Chaetopsylla globiceps*, *Chaetopsylla homoea homoea* Rotschild, *Ct. canis*, *Ct. felis felis* ve *P. irritans* olmak üzere beş pire türü bildirmiştir. Ankara’da yapılan bir çalışmada, Kızıl tilkilerde *Archaeopsylla erinacei erinacei* (Bouché), *Ch. globiceps*, *Chaetopsylla mirabilis* Ioff & Argyropulo, *Chaetopsylla rotschildi* Kohaut, *Ctenophthalmus acuminatus* Ioff & Argyropulo, *Ct. canis*, *Ct. felis felis*, *Paraceras melis melis* (Walker) ve *P. irritans* olmak üzere dokuz pire türü tespit edilmiş ve tilkilerdeki en yaygın türlerin *P. irritans* ve *Ch. globiceps* olduğu bildirilmiştir (Dinçer 1971). Daha önceki çalışmalarda Kızıl tilkilerde *P. irritans*, *Ch. globiceps*, *Ct. canis* ve *Ct. felis felis*’e (Aydın ve ark. 2011), Avrasya porsuğunda (*Meles meles*) *Paraceras melis*’e (Umur ve ark 2019), kirpilerde *A. erinacei erinacei*’ye

(Girişgin ve ark. 2015), Anadolu sincabında *Nosopsyllus fasciatus* (Bosc d'Antic)'a (Girişgin ve ark. 2018), yaban tavşanlarında ise *P. irritans* ve *N. fasciatus*'a (Dik ve Uslu 2018) rastlanmıştır. Bu çalışmada incelenen sekiz Kızıl tilkide üç pire türüne: *Ch. globiceps*, *Ct. canis* ve *P. irritans*'a rastlanmıştır, en yaygın türün *P. irritans* (dört olgu) olduğu ve onu *Ch. globiceps* (iki olgu) takip ettiği gözlenmiştir. Kızıl tilkilerin dışında, Kurt, Vaşak ve Kirpelerde pire enfestasyonu saptanmış, diğer konaklarda pire tespit edilememiştir. Enfeste hayvanlardan en çok *A. erinacei erinacei* (47 adet) toplanmış, onu 24 örnekle *P. irritans* ve 17 örnekle *Ct. felis felis* izlemiştir. *A. erinacei erinacei*'ye sadece kirpelerde, *Ch. globiceps* ve *Ct. canis*'e sadece Kızıl tilkilerde, *Ct. felis felis*'e sadece Vaşakta, *P. irritans*'a ise Kızıl tilki ve Kurtta rastlanmıştır.

Gerek kan emici (Anoplura) ve gerekse çiğneyici (*Amblycera*, *Ischnocera*) bitlere yabancı memelilerde rastlanmakla birlikte (Durdun 1994; Gustafsson ve ark. 2018), Türkiye'de bu konuda çok az kayıt bulunmakta (Girişgin ve ark. 2009; Açıcı ve ark. 2012; Taşçı ve ark. 2017; Dik ve Uslu 2018; Dik ve ark. 2019, 2020; Dik 2020; Eren ve ark. 2021) olup, Türkiye'deki evcil ve yabancı memeli hayvanlarda 38 bit türü tespit edilmiştir (Dik 2020). Açıcı ve ark (2012) karacalardan *Damalinia meyeri* (= *Cervicola meyeri*) (Taschenberg)'yi, Dik ve Uslu (2018) ise yaban tavşanlarından *Haemodipsus lyriocephalus* (Burmeister), *H. setoni* (Ewing) ve *H. leporis* (Blagoveshtchensky) kaydetmişlerdir. Dik (2020) tarafından yayınlanan Türkiye evcil ve yabancı memeli bit faunası kitabında sehven unutulmuş *D. meyeri* ile, kitabın yayınlanmasından sonra bildirilen *Trichodectes (Stachiella) retusa* (Burmeister) (Keskin ve Dik 2023) ve *Felicola (Suricatoecus) vulpis* (Denny) (Eren ve ark. 2021) türleriyle birlikte Türkiye memeli hayvan bit faunasındaki tür sayısı 40'a çıkmıştır. Bu çalışmada incelenen yabancı memeli hayvanlarda bit saptanamamıştır.

Türkiye Hippoboscidae faunası hemen hemen hiç çalışılmamıştır. Her ne kadar bazı cins veya türlerle ilgili kayıtlar varsa da bu çalışmalarda genellikle ya bir türün prevalansı çalışılmış ya bir olgu sunumu olarak sunulmuş (Erdem ve ark. 2019), ya da yapılan çalışmada saptanan Hippoboscid türü ile ilgili veriler (Açıcı ve ark. 2012; Dik ve ark. 2020) bildirilmiştir. *Hippobosca equina* tek turnaklı hayvanların ektoparaziti olmakla birlikte (Maa 1969; Hutson 1984), bu türe sığırlarda da rastlanmaktadır (Maa 1969; Hutson 1984; Kowal ve ark. 2016). Maa (1969) bu türün tek turnaklılarda parazitlendiğini, sığırlarda da görüldüğünü ve rastlansal olarak insan, köpek, tavşan, deve ve bazı kuşlarda bulunabileceğini bildirirken, Kowal ve ark. (2016) bu türün Avrupa'da tek turnaklılarda ve sığırlarda görüldüğünü, fakat primer konağının Kızıl geyik olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada, bu türe bir Yaban atı, bir Kızıl geyik ve bir Vaşakta rastlanmıştır. Vaşak bu türün doğal konağı olmadığı için, muhtemelen aynı barınaktaki diğer hayvanlardan gelen

*H. equina* ile rastlansal olarak enfeste olduğu düşünülmektedir. Maa (1969) *P. canariensis*'in Columbidae (Güvercingiller), Accipitridae ve Falconidae (Gündüz yırtıcıları) başta olmak üzere çok sayıda kuş türünde görüldüğünü bildirmiş, fakat memeli hayvanlarda görüldüğüne dair bir bilgi vermemiştir. Bu türe Türkiye'de, güvercin (Aydın 2009) ve Puhu (*Bubo bubo*)'da (Erdem ve ark 2019) rastlandığı bildirilmiştir. Hippoboscid sineklerden *Lipoptena cervi* (Linneus) ise Karaca ve Kızıl geyiklerden kaydedilmiştir (Açıcı ve ark 2012; Girişgin ve ark 2018). Bu çalışmada, Kızıl geyikte saptanan *P. canariensis*'in de, muhtemelen aynı barınakta, yan tarafta bulunan kafeslerdeki kuşlardan geyiğe geçtiği düşünülmektedir. Cervidae ailesinde (geyikgiller) görülen ve Türkiye'de Karaca ve Anadolu sincaplarında varlığı saptanan *L. cervi*'ye ise bu çalışmada rastlanmamıştır.

Kara kaplumbağalarında (*Testudo graeca*) ektoparazit olarak genellikle *Hyalomma aegyptium*'a rastlanmaktadır (Aysul ve ark. 2010; Bakırcı 2016; Yılmaz ve ark. 2013). Kara kaplumbağalarına özgü olan, fakat diğer hayvanlarda ve hatta insanlarda da parazitlenen bu kene türüne Trakya (Aysul ve ark. 2010) ve Batı Anadolu'da (Bakırcı 2016), Kara kaplumbağalarında yaygın olarak rastlanmıştır. Bu çalışmada incelenen Kara kaplumbağalarından sekizinde kene enfestasyonu saptanmış ve toplanan bütün kenelerin *Hy. aegyptium* olduğu gözlenmiştir. Kara kaplumbağalarının birisinde *Calliphora vicina*'dan, diğerinde ise *Lucilia sericata*'dan kaynaklanan myiasis olgularına rastlanmıştır, bir myiasis olgusunda ise elde edilen larvalar cins ve tür seviyesinde tanımlanamamıştır.

## SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmada incelenen 11 türe ait 29 memeli hayvanın 28'i ektoparazitlerle enfeste bulunmuştur. Enfeste memelilerin 24'ünde (%82.76) ixodid kene, sekizinde (%27.59) pire, dördünde (%13.79) Diptera larvası, üçünde (%10.34) ise Hippoboscid sinek saptanmıştır. Enfeste memelilerde sekiz tür ixodid kene (*D. marginatus*, *Hae. erinacei*, *Hae. parva*, *Hy. marginatum*, *Hy. scupense*, *Ixodes* spp, *Rh. bursa*, *Rh. turanicus*); beş tür pire (*A. erinacei erinacei*, *Ch. globiceps*, *Ct. canis*, *Ct. felis felis*, *P. irritans*) ve iki Hippoboscid sinek türü (*Hippobosca equina*, *Pseudolynchia canariensis*) tespit edilmiştir. Kara kaplumbağalarının sekizinde *Hy. aegyptium*'dan kaynaklanan kene enfestasyonu, üçünde ise travmatik myiasise rastlanmıştır. İncelenen 40 hayvanın 39'u en az bir dış parazit enfeste bulunmuş, enfeste 39 hayvanın 27'sinin (%69.23) tek tür, sekizinin (%20.51) iki tür, ikisinin (%5.13) üç tür, ikisinin (%5.13) ise beş tür ektoparazit türü ile enfeste olduğu gözlenmiştir. Türkiye yabancı memeli ve sürüngenlerinin iç ve dış parazitlerinin belirlenmesi üzerine daha fazla çalışmaların yapılması, parazitler faunalarının belirlenmesi ve bunların evcil memeliler ve/veya

insanlar için önemlerinin vurgulanabilmesi amacıyla çok sayıda araştırma planlanması gerekmektedir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar bu makalede herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

**Yazarların Katkı Oranları:** Yazarlar bu makaleye eşit oranda katkı sağlamışlardır.

**Etik İzin:** Bu çalışma için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu AKUHADYEK -67-23 sayısı ile 12.09.2023 tarihinde izin almıştır.

**Finansal Destek:** --

**Açıklama:** --

**Teşekkür:** Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde emeği geçen Afyon Kocatepe Üniversitesi Yaban Hayatı Kurtarma Rehabilitasyon Eğitim Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğüne, kısmi zamanlı çalışan ve gönüllü öğrencilerine, Arş. Grv. Beste Saraçoğlu'na, Veteriner Hekim Tuğrul Çağrı Gül'e ve Doğa Koruma ve Milli Parklar V. Bölge Müdürlüğü yetkililerine teşekkürü bir borç biliriz.

## KAYNAKLAR

- Açııcı, M., Bölükbaş, C.S., Beyhan, Y.E., Pekmezci, G.Z., Gürler, A.T. & Umur, Ş. (2012). Ectoparasites on roe deer (*Capreolus capreolus*) in Samsun, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 36 (4): 456-459.
- Açııcı, M., Demirtaş, S., Umur, Ş., Gürler, A.T. & Bölükbaş, C.S. (2017). Infestations of flea species on small, wild mammals in the provinces of Aydın and Manisa in the Aegean Region, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 41: 449-452.
- Aksın, N. & Aksın, E. (2002). Elazığ yöresindeki yabani tavşanlarda ektoparazit türlerinin yaygınlığı. 26: 67-70.
- Apanaskevich, D.A. & Horak I.G. (2008). The genus *Hyalomma* Koch, 1844: V. Re-evaluation of the taxonomic rank of taxa comprising the H. (*Euhyalomma*) *marginatum* Koch complex of species (Acari: Ixodidae) with redescription of all parasitic stages and notes on biology. *Int. J. Acarol.* 34: 13-42.
- Apanaskevich, D.A., Filippova, N.A. & Horak, I.G. (2009). The genus *Hyalomma* Koch, 1844. X. Redescription of all parasitic stages of H. (*Euhyalomma*) *scupense* Schulze, 1919 (= H. *detritum* Schulze) (Acari: Ixodidae) and notes on its biology. *Folia Parasitologica*, 71 (1): 69-78.
- Aydın, L., Yıldırımhan, H.S. & Uğurtaş, İ.H. (2002). Marmara Bölgesi'ndeki bazı kertenkele ve kaplumbağa türlerinde keneler (Ixodidae) yaygınlığı. *Türkiye Parazit Derg*, 26: 84-86.
- Aydın, M.F., Balkaya, İ., Aktaş, M. & Dumanlı, N. (2011). Erzurum İlinde Üç Kırmızı Tilkide (*Vulpes vulpes*) Kene (Ixodoidea) ve Pire (Siphonaptera) Türleri. *Türkiye Parazit Derg*, 35: 110-113.
- Aysul, N., Kar, S., Yilmazer, N., Alp, H.G. & Gargılı, A. (2010). Trakya Yöresi'ndeki kaplumbağalarda (*Testudo graeca*) *Hyalomma aegyptium* (Linnaeus, 1758)'un yaygınlığı. *Pendik Vet Mikrobiol Derg*. 37 (1): 53-56.

- Bakırcı, S. (2016). Prevalance of *Hyalomma aegyptium* (Linnaeus, 1758) on Tortoises (*Testudo graeca*) in Izmir and Aydın province, Turkey, *Etlık Vet Mikrobiyol Derg*, 27: 5-7.
- Beaucournu, J.C. & Launay, H. (1990). Les Puces (Siphonaptera): de France et du Bassin méditerranéen occidental. *Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles*, Paris, 548 p.
- Dik, B. (2020). Türkiye'deki evcil ve yabani memelilerde görülen bit (Phthiraptera) türleri. *Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 26*, 67 sayfa.
- Dik, B. & Orunç-Kılınc, Ö. (2015). The first case of *Trichodectes pinguis* (Phthiraptera: Ischnocera: Trichodectidae) on a Bear (*Ursus arctos*) in Turkey. *Türkiye Parazit Derg*, 39, 313-315. DOI: 10.5152/tpd.2015.4040
- Dik, B. & Uslu, U. (2007). *Haemodipsus* Species Occurring on Hares (*Lepus europaeus* L.): Two New Species in Turkish Lice Fauna. *Türkiye Parazit Derg*, 31 (2): 119-122.
- Dik, B. & Uslu, U. (2008). Türkiye'de, Konya yöresindeki yaban tavşanlarında (*Lepus europaeus* L.) bulunan *Haemodipsus* (Anoplura: Polyplacidae) türlerinin yaygınlığı. *Türkiye Parazit Derg*, 32 (2): 146-148.
- Dik, B. & Uslu, U. (2018). Ectoparasites of hares (*Lepus europaeus*, Pallas) in Konya province, Turkey. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 42, 65-72.
- Dik, B., Uslu, U. & Işık, N. (2012). Myiasis in animals and humanbeings in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*; 18 (1): 37-42.
- Dik, B., Selçuk, A.Y., Kefelioğlu, H. & Keskin, A. (2019). A preliminary report of the sucking lice (Insecta: Phthiraptera: Anoplura) of some small mammals of Turkey with four new records. *Transactions of The American Entomological Society*, 145 (3): 395-406. <https://doi.org/10.3157/061.145.0301>
- Dik, B., Ceylan, O., Ceylan, C., Tekindal, M.A., Semassel, A., Sönmez, G. & Derinbay Ekici, Ö. (2020). Ectoparasites of feral horses [*Equus ferus caballus* (Linnaeus,1758)] on Karadağ Mountain, Karaman, Turkey. *Journal of Parasitic Disease*, 44 (3): 590-596. DOI: 10.1007/s12639-020-01234-4
- Diñer, Ş. (1971). Ankara ve çevresinde kedi (*Felis domesticus*), köpek (*Canis familiaris*) ve tilki (*Vulpes vulpes*)'lerde bulunan pire (Siphonaptera)'ler üzerinde sistematik araştırmalar. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları: 277, Çalışmalar: 179, Ankara, 94 sayfa.
- Domínguez-Peñafiel, G., Giménez-Pardo, C., Gegúndez, M.I. & Lledó, L. (2011). Prevalence of ectoparasitic arthropods on wild animals and cattle in the Las Merindades area (Burgos, Spain). *Parasite*, 18: 251-260.
- Durden, L.A. & Musser, G.G. (1994). The sucking lice (Insecta, Anoplura) of the world: A checklist with records of mammalian hosts and geographical distributions. *Bull Am Mus Nat Hist*, 218: 1-90.
- Erdem, I., Zerek, A. & Yaman, M. (2019). The first record *Pseudolynchia canariensis* (Diptera: Hippoboscidae) in an Eurasian eagle owl (*Bubo bubo* Linnaeus, 1758) in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*; 25 (6): 887-888. DOI: 10.9775/kvfd.2019.22882
- Eren, G., Gürler, A.T., Gencay Topcu, E.B., Tuygun, T. & Açııcı, M. (2021). Türkiye'de Bir Kızıl Tilkide (*Vulpes vulpes*) *Felicola* (*Suricatoecus*) *vulpis* (Phthiraptera: Trichodectidae) Enfestasyonunun İlk Bildirimi. *Türkiye Parazit Derg*, 45 (2): 157-159.
- Estrada-Peña, A. (2015). Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*; 34 (1): 53-65.
- Estrada-Peña, A., Pfäffle, M. & Petney, T.N. (2017). Ticks of Europe and North Africa. A guide to species identification. Springer International Publishing, Cham, Switzerland; <https://doi.org/10.1007/978-3-319-63760-0>

- Galloway, T.D. (2011).** Ectoparasites of rabbits and hares in Manitoba, Canada, with observations on age-specific dispersal in *Haemodipsus setoni* (Phthiraptera: Anoplura: Polyplacidae). *Can Entomol*, 144: 439-446.
- Girişgin, O., Girişgin, A.O., Sönmez, F. & Akyol, Ç.V. (2009).** Occurrence of *Haematopinus suis* Linnaeus, 1758 (Insecta, Anopluridae) on a wild boar (*Sus scrofa*). *Turk J Vet Anim Sci*; 33: 529-530.
- Girisgin, A.O., Senlik, B., Aydin, L. & Cirak, V.Y. (2015)** Ektoparasiten beim Igel (*Erinaceus concolor*) in der Türkei. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 128 (7–8), 315–318 (in German).
- Girişgin, A.O., Çimenlikaya, N., Bah, S.A., Aydın, L. & Girişgin, O. (2018).** "Türkiye’de bazı yabancı memelilerde bulunan dış parazit türlerinin ilk kayıtları". *Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi*, 37 (2): 133-136.
- Goz, Y., Yilmaz, A.B., Aydın, A. & Dicle, Y. (2016).** Ticks and Fleas Infestation on East Hedgehogs (*Erinaceus concolor*) in Van Province, Eastern Region of Turkey. *J Arthropod-Borne Dis*, 10 (1): 50-54.
- Gustafsson, D.R., DiBlasi, E., Olsson, U., Najer, T., Sychra, O. & Bush, S.E. (2018).** Checklist and key to the lice (Insecta: Phthiraptera) of Sweden. *Ent Tidskr*, 139 (4): 205-394.
- Hutson, A.M. (1984).** Keds, flat-flies and bat-flies. Diptera, Hippoboscidae and Nycteribiidae. In "Handbooks for the identification of British insects, Ed. MG Fitton". Vol. 10, Part 7. Royal Entomological Society of London. Dramrite Printers Limited, Southwark, London SE1: 40p.
- Karaer, Z., Yukarı, B.A. & Aydın, L. (1997).** Türkiye Keneleri ve Vektörlükleri. In: M.A. Özcel, N. Daldal, Eds. *Parazitoloji’de Artropod Hastalıkları ve Vektörler*. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 13: 405-418.
- Keskin, A., Selcuk, A.Y. & Kefelioğlu, H. (2017).** Ticks (Acari: Ixodidae) infesting some small mammals from Northern Turkey with new tick-host associations and locality records. *Experimental and Applied Acarology*, 73: 521-526. doi: 10.1007/s10493-017-0182-2
- Keskin, A., M. W. Hastriter & J.-C. Beaucourmu. (2018).** Fleas (Siphonaptera) of Turkey: Species composition, geographical distribution and host associations. *Zootaxa*. 4420: 211–228.
- Keskin, A., Selcuk, A.Y. & Kefelioğlu, H. (2019).** Ticks (Acari: Ixodidae) infesting some wild animals and humans in Turkey: notes on a small collection. *Acarological Studies*, 1(1): 11-15.
- Keskin, A. & Dik, B. 2023.** First data on the ectoparasites (ticks, lice and fleas) of the stone marten, *Martes foina* (Erxleben) in Turkey. *Arthropods*, 12 (3): 141-147.
- Kočiřová, A., Lazar, P., Letková, V., Čurlík, J. & Goldová, M. (2006).** Ectoparasitic species from red foxes (*Vulpes vulpes*) in East Slovakia. *Veterinarski Arhiv (Vet arhiv)*, 76 (Suppl): 59-63.
- Kowal, J., Nosal, P., Kornaş, S., Wajdzik, M., Matysek, M. & Basiaga, M. (2016).** Biodiversity and importance of hippoboscids infection in cervids. *Med Weter*, 72 (12): 745-749.
- Maa, T.C. (1969).** A revised checklist and concise host index of Hippoboscidae (Diptera). *Pacific Insectes Monograph*, 20: 261-299.
- Merdivenci, A. (1965)** Türkiye’nin Entomolojik Coğrafyası. In: Türkiye’nin Parazitolojik Coğrafyası. 114-152 pp. (Unat EK, Yaşarol Ş & Merdivenci A Eds). Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları No: 42, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, Turkey.
- Ruiz-Fons, F., Fernández-de Mera, I.G., Acevedo, P., Höfle, U., Vicente, J., de la Fuente, J. & Gortazár, C. (2006).** Ixodid ticks parasitizing Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: Geographical and temporal distribution. *Vet Parasitol*, 140: 133-142.
- Santos-Silva, M.M., Beati, L., Santos, A.S., De Sousa, R., Nu’ncio, M.S., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C. & Bacellar, F. (2011).** The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Exp Appl Acarol*, 55: 85-121.
- Szpila, K. (2010).** Key for the identification of third instars of European Blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance. In "Current Concepts in Forensic Entomology. Eds. Amendt J, Goff ML, Campobasso CP, Grassberger M", pp. 43-56. Springer, Dordrecht Heidelberg London New York.
- Şekercioğlu, Ç.H., Anderson, S., Akçay, E., Bilgin, R., Can, Ö.E., Semiz, G., Tavşanoğlu, Ç., Yokeş, M.B., Soyumert, A., İpekdal, K., Sağlam, İ.K., Yücel, M. & Dalfes, H.N. (2011).** Turkey’s globally important biodiversity in crisis. *Biological Conservation*, 144: 2752-2769.
- Taşçı, G.T., Erkiş, E.E., Parmaksızoğlu Aydın, N. & Uzlu, E. (2017).** First Report of *Trichodectes melis* (Phthiraptera, Trichodectidae) from the Eurasian Badger *Meles canescens* (Carnivora, Mustelidae) in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 23 (6): 1015-1017.
- Thyssen, P.J. (2010).** Keys for Identification of Immature Insects. In "Current Concepts in Forensic Entomology. Eds. Amendt J, Goff ML, Campobasso CP, Grassberger M", pp. 25-42. Springer, Dordrecht Heidelberg London New York.
- Umur, Ş., Bölükbaş, C.S., Açıcı, M., Ateş, C. & Gürler, A.T. (2019).** Bir Avrasya porsuğunda (*Meles meles*) rastlanan parazitler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 66: 317-320.
- Uslu, U., Dik, B. & Gökçen, A. (2008).** Ectoparasites of ground squirrel (*Citellus citellus* (L.)) in turkey. *Türkiye Parazitol Derg*, 32 (2): 142–145.
- Yılmaz, A.B., Değer, S. & Bulduk, B. (2013).** Van İli Erciş İlçesindeki Kara Kaplumbağalarında (*Testudo graeca*, Linnaeus, 1758) Kene Enfestasyonları. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24 (2): 69-72.
- Zumpt, F. (1965).** Myiasis in Man and Animals in the Old World. Butterwoths & Co. Ltd., London.



## Goat Sperm Vitrification

Çiğdem ÇEBİ<sup>1\*</sup>, Ricardo FAUNDEZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Harran Kocatepe University, Sanliurfa, Türkiye

<sup>2</sup> InviMed Fertility Clinics, 02-532 Warsaw, Poland

### ABSTRACT

The vitrification method is a freezing method in which the cooling rate is very high and high concentration permeable cryoprotectants are used. The vitrification method, which has a wide application area in embryo freezing, was applied to the storage of goat semen and the effect of the vitrification method on semen quality was determined. For this purpose, semen samples taken from 4 healthy goats via artificial vagina were divided into 4 equal groups. While the semen samples in Group 1 were frozen with the conventional method with Tris-sitrate modified solution containing 20% egg yolk and 5% glycerol, the remaining sperm samples were frozen with 0.1 M (Group II), 0.25 M (Group III) and 0.5 M (Group IV) was diluted with Human Tubal Fluid diluent containing sucrose and vitrification method was applied. Standard semen analysis (spermatozoa motility, plasma membrane integrity, sperm morphology, chromatin integrity) was performed on all semen samples after conventional freezing and vitrification. As a result, attempts to vitrify goat spermatozoa using non-permeable cryoprotectants have resulted in very low viability. The physical and chemical changes occurring during vitrification negatively affected the motility, viability and sperm morphology of spermatozoa.

**Key Words:** Goat, Semen, Sucrose, Vitrification

\*\*\*

### Teke Spermasının Vitrifikasyonu

#### ÖZ

Vitrifikasyon metodu, soğutma hızının çok yüksek olduğu, yüksek konsantrasyonlu permeable kriyoprotektanların kullanıldığı bir dondurma yöntemidir. Embriyo dondurulmasında oldukça geniş uygulama alanı bulan vitrifikasyon methodunun teke spermasının saklanması için uygulanarak sperma kalitesi üzerine vitrifikasyon methodunun etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla 4 sağlıklı tekedan suni vajen yoluyla alınan sperma örnekleri 4 eşit gruba ayrılmıştır. Grup 1'deki sperma örnekleri %20 yumurta sarısı ve %5 gliserol içeren Tris-Sitrat modifiye solüsyonu ile konvansiyonel metotla dondurulurken, geri kalan sperma örnekleri ise 0.1 M (Grup 2), 0.25 M (Grup 3) ve 0.5 M (Grup 4) sükröz içeren Human Tubal Fluid sulandırıcısı ile sulandırılıp vitrifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Tüm sperma örneklerinde konvansiyonel dondurma ve vitrifikasyon işlemi sonrası standart sperma analizi (spermatozoa motilitesi, plasma membran bütünlüğü, spermatozoa morfolojisi, kromatin bütünlüğü) yapılmıştır. Sonuç olarak, non-permeable kriyoprotektanlar kullanılarak teke spermatozoasını vitrikiye etmek için girişilen deneyimler çok düşük canlılıkla sonuçlanmıştır. Vitrifikasyon sırasında oluşan fiziksel ve kimyasal değişiklikler, spermatozoanın motilitesini, canlılığını, spermatozoa morfolojisini olumsuz şekilde etkilemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Sperma, Sükröz, Teke, Vitrifikasyon

To cite this article: Çebi Ç, Faundez R. Goat Sperm Vitrification. Kocatepe Vet J. (2023):16(4): 521-529

Submission: 20.09.2023 Accepted: 21.11.2023 Published Online: 11.12.2023

ORCID ID; CC: 0000-0001-6876-2069, RF: 0000-0002-5171-4615

\*Corresponding author e-mail: cigdemcebi@harran.edu.tr

## GİRİŞ

Reproduksiyon teknolojisinden bağımsız olarak, kriyobiyoloji teknolojisi, yirminci yüz yılın başlarından beri gelişmektedir. Bilindiği gibi kriyoprezervasyon işlemindeki amaç, çok düşük bir sıcaklıkta canlı bir hücre veya dokunun minimum hasarla fonksiyon kaybı oluşturmaksızın uzun süreli saklanmasıdır (Tunalı 2014). Keçilerde dondurulmuş sperma ile yapılan suni tohumlamalardan elde edilen fertilitate oranı büyükbaş hayvanlarda yapılan suni tohumlamalara oranla daha düşüktür. Bunun nedenlerinden biri de kullanılan sperma dondurma tekniklerinin yeterince geliştirilememiş olması olabilir (Kulaksız ve Daşkın 2009). Konvansiyonel kriyoprezervasyon tekniği küçükbaş hayvan spermasının saklanması kapsamlı bir şekilde uygulanmakta olsa da yavaş dondurma sırasında hücre içi veya hücre dışı buz kristali oluşumu ve ozmotik değişikliklerin meydana gelebileceği, bunun da aşırı hücre büzülmesine ve spermatozoa hasarına yol açtığı bilinmektedir (Jiménez-Rabadán ve ark 2015). Hücre içi buz kristali oluşumunun, dondurma sırasında spermatozoa hücresinde meydana gelen ana hasarın nedenlerinden biri olduğu ve suni tohumlamadan sonra üreme etkinliğini azalttığı iyi bilinmektedir. Ayrıca konvansiyonel dondurmada, lipid faz geçişindeki değişiklikler sonucu reaktif oksijen türlerinin üretimi ile lipid peroksidasyonundaki artışa bağlı olarak hareketli spermlerin hız ve yüzdesinde azalma ve fertilizasyon potansiyelinde önemli kayıplar meydana geldiği de rapor edilmiştir (Barbosa ve ark. 2023; Gharajelar ve ark. 2016). Konvansiyonel yavaş dondurmaya alternatif olarak doku veya organlarda buz kristal oluşumunu engellemek için yüksek kriyoprotektan konsantrasyonu gerektiren vitrifikasyon metodu geliştirilmiştir (Jiménez-Rabadán ve ark. 2015). Geleneksel dondurma işlemlerinden farklı olarak vitrifikasyon metodu yüksek kriyoprotektan konsantrasyonu ile hızlı dondurma/çözdürme hızını içerir ve bu iki faktörün kombinasyonu ile viskozitesi hızla artan bir solusyon içerisinde buz kristali oluşumu olmadan sulu çözeltilerin sıvı halden camsı hale doğrudan geçişini içerir (Mukaida ve ark. 1998; Vajta ve Nagy 2006). Buz kristal oluşumunu engellemesi yanında ayrıca maliyetinin az olması, kısa sürede ve kolay uygulanabilir olması ile memeli embriyo dondurulmasında vitrifikasyon methodu oldukça geniş uygulama alanı bulmuştur ve başarıyla kullanılmaktadır. Ancak embriyo vitrifikasyon prosedürünün spermatozoa kriyoprezervasyonunda doğrudan kullanımı, spermatozoanın toksik ve ozmotik strese karşı yüksek duyarlılığı nedeniyle uygun değildir (Le ve ark. 2019). Ayrıca, embriyo çok hücreli bir yapıya sahiptir ve bu nedenle, embriyodaki bazı hücreler kriyohasar nedeniyle hasar görse bile, kalan canlı hücreler yine de bu ölü hücrelerin yerini almak için çoğalabilirler. Spermatozoa ise transkripsiyon ve translasyon kabiliyetine sahip

olmayan tek hücredir ve bu nedenle kriyohasardan kurtulamaz (Lv ve ark. 2019). Vitrifikasyon yönteminde ise yavaş kademeli soğutma yönteminden farklı olarak yüksek konsantrasyonda kriyoprotektan ajanlar kullanılmakta (4-8 mol/l), seeding ve yavaş soğutma işlemi olmadan hücreler çok hızlı bir şekilde (15.000-30.000°C/dk) soğutulmaktadır (Fahy ve Rall 2007). Bu nedenle yüksek kriyoprotektan konsantrasyonunun spermatozoa hücreleri üzerine toksik etkisinden dolayı, vitrifikasyon metodunun erkek gametlerin dondurularak saklanması için uygun bir method olmadığı görüşü uzun yıllardır popülerdi (Lv ve ark. 2019; Sánchez ve ark. 2011). Aslında, spermatozoanın vitrifikasyonu yeni bir kavram olmamakla beraber spermanın başarılı şekilde ilk vitrifiye edilmesi 1938 yılında kurbağalarda gerçekleştirilmiştir. Fakat soğutmanın kritik hızından dolayı memeli spermasını vitrifiye etmek için girişilen ilk deneyimler ya düşük ya da sıfır canlılıkla sonuçlanmıştır (Isachenko ve ark. 2012; Lv ve ark. 2019; Sánchez ve ark. 2011). Hücreleri çevreleyen medyum viskozitesi artırılarak, hücre içi ve hücre dışı kristal oluşumunu engellemek için karbonhidrat, protein ve diğer ekstraselüler ajanlar kullanılarak ve soğutma oranı artırılarak solusyonlardan permeabl kriyoprotektanlar uzaklaştırıldıktan sonra insan spermasının vitrifiye edilmesinden sonra elde edilen sonuçlardan dolayı son çalışmalarda bu durum tersine dönmüştür (Isachenko ve ark. 2012; Lv ve ark. 2019; Sánchez ve ark. 2011). Kriyoprotektanlar materyalin donma noktasını azaltarak buz kristal oluşumundan ya da donma hasarından spermatozoayı korumak için hizmet eden düşük molekül ağırlıklı kimyasallardır (Wetzels ve ark. 1996). Plazma membranlarına penetre olma yeteneklerine göre iki çeşit kriyoprotektan vardır ve hücrelerin çoğu kriyoprotektan ajanlar kullanılmaksızın canlı kalmaz. Dimetilasetamid, dimetilsülfoksit, gliserol, glikol, etilen ve methanol gibi permeabl olan kriyoprotektanlar hücre membranı proteinini stabilize ederek elektrolitlerin konsantrasyonunu azaltırlarken, albümin, dekstran, polietilen glikol, polivinilprolidone ve sükroz gibi non-permeabl kriyoprotektanlar ise, dondurma sırasında suyun hücre içinden hücre dışı ortama geçişini uyararak buz kristallerinin oluşumunu minimize ederek dış ortamın ozmolaritesinde bir artışa neden olarak destekleyici rol oynarlar (Barbosa ve ark. 2023). Isachenko ve ark. (2008) 30 µl insan sperma damlacıklarını (30 µl) insan tubal sıvısı, %1 insan serumu ve non-permeabl kriyoprotektan olan 0.25 M sükroz ile seyreltilmesi sonrası vitrifiye edilen spermatozoonların çözdürme sonrası hayatta kaldığını buldu. Daha sonra balık spermasında da benzer sonuçlar rapor edildi (Merino ve ark. 2011). Bu çalışmalar sperma vitrifikasyonunun mümkün olabileceğini ima eden anlamlı ve cesaret verici çalışmalardı (Lv ve ark. 2019). Sükrozun vitrifikasyon işlemi sırasında hücresel strese karşı ozmotik bir tampon görevi gören potansiyel bir kriyoprotektan olduğu ve kriyohasaratları azalttığı bir çok çalışmada

rapor edilmiştir (Shah ve ark. 2019; Zakošek ve ark. 2020). Fakat spesifik olarak tekeler için, spermayı muhafaza etmek için alternatif yöntemlerin kullanımına ilişkin çok az bilgi mevcuttur. Bu amaçla, çalışmamızda non-permeabl bir kriyoprotektan olan sükrözün farklı dozlarının spermaya eklenmesi ile teke spermasının vitrifikasyonu sağlanarak sperma kalitesi üzerine vitrifikasyon prosedürünün etkisi belirlenmiştir.

## MATERYAL ve METOT

Çalışmada, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi araştırma uygulama çiftliğinde bakım beslemesi yapılan 4 adet teke kullanıldı. Çalışma için, 19.02.2015 tarih 2015/02 sayılı izin belgesi, DOLLVET Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır. Tekelerden haftada iki kez olmak üzere suni vajen yöntemi ile sperma alındı ve sperma hacmini artırmak ve aralarındaki değişkenliği ortadan kaldırmak için her bir ejakulat her seferinde pooling yapıldı. Spermalar kullanılıncaya kadar 37°C'de su banyosunda bekletildi. Tekelerden suni vajen kullanılarak alınan sperma örneklerinde ejakulatların makroskobik ve mikroskobik değerlendirilmeleri (miktar, motilite, yoğunluk, anormal spermatozoa oranı, membran bütünlüğü) yapıldıktan sonra sperma parametreleri; %80'den fazla progresif motilite gösteren ve yoğunluğu  $2.0 \times 10^9$  spermatozoa.ml<sup>-1</sup>, membran bütünlüğü >%70, toplam anormal spermatozoa oranı <15 olan ejakulatlar çalışmada kullanıldı. Suni vajen yoluyla alınan sperma örnekleri 4 eşit gruba ayrıldı ve çalışma altı tekrardan oluşturuldu. Grup 1 (Kontrol grubu)'deki sperma örnekleri final konsantrasyonu yaklaşık  $100 \times 10^6$  spermatozoa.ml<sup>-1</sup> olacak şekilde %20 yumurta sarısı ve %5 gliserol içeren Tris-Sitrat modifiye solüsyonu ile sulandırılıp 0.25 ml payetlere çekilerek konvansiyonel metotla dondurma işlemi gerçekleştirildi (Ömür ve Çoyan 2014). Geri kalan sperma örnekleri ise deney gruplarını oluşturdu ve vitrifikasyon işlemine tabi tutuldu. Bu yöntem Isachenko ve arkadaşları (2012) tarafından belirlenen metoda göre yapıldı. Temel sulandırıcı olarak Human Tubal Fluid (HTF) solüsyonu kullanıldı. Vitrifikasyon işleminden önce sperma örnekleri, 0.1 M (Grup 2), 0.25 M (Grup 3) ve 0.5 M (Grup 4) farklı konsantrasyonlarda sükröz ve %1 Bovine Serum Albumin (BSA) içeren Human Tubal Fluid (HTF) sulandırıcısı (vitrifikasyon solüsyonu) ile 1:1 oranında sulandırıldı. Her bir sperm örneği santrifüj edildi ve final konsantrasyonu  $2 \times 10^6$  spermatozoa.ml<sup>-1</sup> olacak şekilde yeniden aynı vitrifikasyon solüsyonu ile resüspanse edildi. Spermanın saklanması için 50 µl'lik (Gynemed GmbH, Lensahn, Germany) plastik kapillerler kullanıldı. Bu kapillerler 10 µl'lik sperm süspansiyonu ile dolduruldu. Aspirasyon işlemi tamamlandıktan sonra bu plastik kapillerler 0.25 ml'lik payetler içine yerleştirildi. Payetin iki ucu emin bir şekilde kapatıldıktan sonra direkt sıvı azot içerisine daldırıldı. Çözdürme işlemi yapılmadan önce en az 1

hafta sıvı azot içinde kalmaları sağlandı. Çözdürme işlemi ise, kapillerler 0.25 ml'lik payetlerden uzaklaştırıldı. Payetin üst ucu kapillerin ucuna yakın olabildiği kadar yakından steril bir makasla kesildi ve spermatozoa süspansiyonu sperma kalitesini değerlendirmek için kapillerden uzaklaştırıldı. Yaklaşık 20 saniye 37°C'de 0.7 ml vitrifikasyon medyumuna ile sulandırılıp santrifüj edildi ve çözdürülen payetlerden spermatozoa muayeneleri için örnekler alınıp incelendi. Konvansiyonel metotla dondurulan (Grup 1) sperma örnekleri ise 37°C'lik su banyosunda 30 saniye çözdürülerek payetlerden spermatozoa muayeneleri için örnekler alınıp incelendi.

## Spermatozoa Parametreleri

### Spermatozoa Motilitesi

Motilite muayenesi, ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskopta (Olympus BX-51, Tokyo, Japan) yapıldı. Bu amaçla lam üzerine üç ayrı noktaya 5 µl sperma konup üzeri lamelle kapatıldı ve 20'lik objektifte yüzde oranı ile belirlendi.

### Plasma Membran Bütünlüğü

Spermatozoon membrane bütünlüğü, çift filtreli fluoresan mikroskopu (Olympus BX-51, Tokyo, Japan) ve Propidium iodide (PI)/SYBR-14 viability kiti (Invitrogen) kullanılarak belirlendi. Bunun için ependorf tüplerine final konsantrasyonu  $1.5 \times 10^6$ .ml<sup>-1</sup> sperma konup üzerine 5 µl SYBR-14 eklenerek 10 dakika bekletildi. Ardından üzerine 5 µl PI eklenip tekrar 10 dakika bekletildi. Bu süre sonunda 3 µl örnek lam üzerine konup üzeri lamel kapatılarak 100 spermatozoa sayıldı. PI ile boyanıp ve kırmızı floresan yayanlar ölü, SYBR-14 ile boyanan ve yeşil floresan renk verenler canlı olarak kabul edildi (Cebi Sen ve ark. 2018).

### Spermatozoa Morfolojisi

Spermatozoa morfolojisinin değerlendirilmesinde SpermBlue boyama metodu kullanıldı. 10 µl sperma örneğinden smear yapılarak havada kurutuldu. Smear vertikal olarak SpermBlue fiksatifinin içine daldırıldı ve oda ısısında 10 dakika bekletildi ve 10-12 dakika kadar da SpermBlue boyasına daldırıldı. Aşırı boyamanın alınmasını önlemek için 3 saniye içinde distile suya batırılıp preparatlar havada kurutulduktan sonra immersiyon yağı kullanılarak ışık mikroskobunda X400 büyütmede değerlendirildi. Spermatozoa defeklerinin yüzdesi en az 100-300 spermatozoa sayılarak belirlendi (Van der Horst ve Maree 2009).

### Spermatozoon Kromatin Ayrılma Testi (Halosperm Test)

Spermatozoon DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi in vitro diagnostik kit olan halomax (DNA Halotech SL (Halomax, Spain) kitinin protokülüne göre uygulanarak yapıldı. Spermayı lam üzerine fikse etmek için agaroz mikro jel önce 5 dk

90°C-100°C daha sonra ise 37°C'deki su banyosunda 5 dk bekletilerek 25 µl sperma örneği ilave edilerek karıştırıldı. Karışımından 15-20 µL'lik bir örnek slayt üzerine konuldu ve içindeki agarı katılaştırmak için +4 derecede 5 dakika buzdolabında bekletildi. Asit denaturasyon solüsyonunu hazırlamak için 10 ml distile suya 80 µL denatüre edici solüsyon eklendi. Slayt buzdolabından çıkarılarak yatay konumda denatüre edici solüsyonda 7 dakika ardından da 10 ml lizis solüsyonunda 25 dakika inkübasyona bırakıldı. Lizis solüsyonundan arındırmak için slayt distile suda 5 dakika boyunca bekletildi. Sonra sırasıyla %70, %90 ve %100'lık etil alkol solüsyonlarında ikişer dakika bekletilip oda ısısında kurutularak Diff-Quik boyası ile boyandı. Slaytlarda floresan ataçmanlı faz-kontrast mikroskop kullanılarak 100 spermatozoa sayıldı. Spermatozoon nükleusu etrafında oluşan halonun genişliği ölçülerek spermatozoon DNA'sının hasarlı olup olmadığı değerlendirildi. Spermatozoon etrafında büyük halo oluşumu DNA fragmentasyonu için negatif olarak değerlendirilken, hiç halo olmaması ya da küçük bir halo gözükmesi DNA fragmentasyonu için pozitif olarak değerlendirildi (Cebi Sen ve ark. 2018).

### İstatistik

İstatistiksel analizler 'SPSS statistic 26 paket programı' ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama standart sapma olarak gösterilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde nonparametrik Kruskal Wallis H testi kullanılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde  $p < 0,05$  istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklı konsantrasyonlarda (0.1 M, 0.25 M ve 0.5 M)

sükroz içeren deneme gruplarındaki spermatozoa motilitesindeki azalma kontrol grubuna göre (%65,83±3,8) önemli derecede azalmıştır ( $p < 0,010$ ). Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'deki spermatozoa motilitesindeki azalma benzer özellik göstermekte olup, aralarında istatistiksel fark yoktur. Membran bütünlüğü gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık göstermiştir ( $p < ,001$ ). Kontrol grubu (%70±1,4) ile karşılaştırıldığında, farklı sükroz konsantrasyonuna bağlı olarak en düşük plazma membran bütünlüğü Grupta 2 (%2,0±,0)'de elde edilirken, en yüksek plazma membran bütünlüğü Grupta 3 (%3,50±,6)'de elde edilmiştir. Grup 4 ise, Grup 2 ve Grup 3 ile benzerlik göstermiştir (Tablo 1). Kontrol grubu (%20±,0) ile vitrifikasyon grupları karşılaştırıldığında tüm gruplardaki spermatozoa morfolojisindeki farklılıklar önemli bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda anormal spermatozoa oranı tüm gruplarda artmıştır. 0.1 M (Grup 2) sükroz eklenmesi sonucu anormal spermatozoa oranı (%54,67±4,1) diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuştur. 0.25 M (Grup 3) sükroz eklenen grupta anormal spermatozoa oranı %34,0±2 iken, 0.5 M (Grup 4) sükroz eklenen grupta %42,17±3,4 olarak bulunmuştur. Grup 4'ün anormal spermatozoa oranı Grup 3'ten ve Grup 2'den yüksek bulunmuştur ( $p < ,001$ ).

Spermatozoa DNA fragmentasyon oranı bulguları gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık göstermiştir ( $p < ,027$ ). Grup 1 ve Grup 3'ün DNA fragmentasyon oranı benzer olmakla beraber sırası ile %4,67±1,9 ile %4,50±,6 olarak bulunmuştur. Grup 2'nin DNA fragmentasyon oranı %3,67±,8 olarak en düşük bulunurken, Grup 4'de 0.5 M sükroz eklenen grupta %5,83±,8 ile en yüksek değer bulunmuştur.

**Tablo 1.** Gruplara göre sperm parametrelerinin karşılaştırılması

**Table 1.** Comparison of sperm parameters according to groups

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Test/p
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Motilite	<sup>a</sup> 65,83±3,8	<sup>b</sup> 1±,0	<sup>b</sup> 2,17±,4	<sup>b</sup> 1,5±,6	<b>KW:19,965</b> <b>p:;000</b>
Membran bütünlüğü	<sup>a</sup> 70±1,4	<sup>c</sup> 2±,0	<sup>b</sup> 3,50±,6	<sup>bc</sup> 2,50±,6	<b>KW:20,168</b> <b>p:;000</b>
Morfoloji	<sup>d</sup> 20±,0	<sup>a</sup> 54,67±4,1	<sup>c</sup> 34±2	<sup>b</sup> 42,17±3,4	<b>KW:22,060</b> <b>p:;000</b>
DNA fragmentasyon oranı	<sup>ab</sup> 4,67±1,9	<sup>b</sup> 3,67±,8	<sup>ab</sup> 4,50±,6	<sup>a</sup> 5,83±,8	<b>KW:9,155</b> <b>p:;027</b>

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak gösterilmiştir (n=4). Aynı satırdaki farklı üst simgeler arasında fark vardır. Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır ( $p < 0,0125$  anlamlı kabul edilmiştir).

Results are shown as mean±standard deviation (n=4). There is a difference between different superscripts on the same line. Bonferroni correction was made ( $p < 0,0125$  was considered statistically significant).

## TARTIŞMA

Bu çalışmada teke spermasını vitrifiye etmek için non-permeabl bir kriyoprotektan olan sükrözün farklı dozları kullanılarak sperma kalitesi üzerine etkisi belirlendi. Kriyo yöntemlerin etkinliğinin, permeable ve permeable olmayan kriyoprotektanların kullanımı ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Sánchez ve ark. 2011). Embriyo ve oosit dondurulmasında kullanılan standart vitrifikasyon tekniğinde yüksek konsantrasyonlu permeable kriyopektanların zararlı osmotik etkilerinden dolayı, direk olarak memeli spermasını başarı ile dondurmak olası olmadığından, permeable kriyoprotektanlar olmadan spermanın sıvı nitrojene doğrudan daldırılmasıyla spermanın vitrifikasyonu sağlanmıştır (Isachenko ve ark. 2004b). Bu amaçla yumurta sarısı veya permeable kriyoprotektanlar kullanılmadan non-permeable kriyoprotektan olarak proteinler ve şekerler kullanılarak spermanın vitrifikasyonu yapılabileceği rapor edilmiştir (Jiménez-Rabadán ve ark. 2015). Böylelikle yeni gelişmekte olan bu method ile kriyohasarlardan hücrelerin korunmasına olanak sağlanarak, toksik olan permeabl kriyopektanların kullanımı azaltılabilecektir. Bu amaçla insan spermasının sıvı nitrojene doğrudan daldırılarak kriyoprezervasyon için glikoz, sükröz ve trehaloz kullanımı araştırılmış (Isachenko ve ark. 2004a; Liu ve ark. 2016; Schulz ve ark. 2006) ve istatistiksel olarak çözündürme sonrası en iyi spermatozoa motilitesi ve canlılığının sulandırıcıya sükröz eklenmesi ile elde edildiği rapor edilmiştir. Arandoa ve ark. (2017)'nin raporuna göre, sükrözün koç spermasını vitrifiye etmek için potansiyel bir kriyoprotektan görevi görebileceği ve kriyohasarlara azaltılabileceği rapor edilmiştir. Koshimoto ve Mazur (2002) ise üç farklı şekeri (monosakarit glikoz, disakkarit sükröz ve trisakarit rafinoz) araştırmış ve dondurma/çözündürme sonrası kriyohasarlara karşı korumada şekerin türünden daha çok şekerin konsantrasyonuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Mevcut olan bu veriler ışığında var olan bu çalışmada teke spermasını vitrifiye etmek için soğuk şokunu azaltmak amacı ile şeker kökenli non-permeable bir kriyoprotektan olan sükrözün üç farklı dozu kullanıldı. Küçükbaş hayvan spermasının vitrifikasyonu ile ilgili şu ana kadar sınırlı sayıda bilgi mevcuttur. Çalışmamızda vitrifiye teke spermasından elde edilen sperma kalitesi, konvansiyonel dondurma protokolü kullanılarak elde edilen sperma kalitesinden oldukça düşük bulunmuştur. Sonuçlarımızın aksine Pradice ve ark. (2017) İber dağ keçisinde epididimal spermayı, Isachenko ve ark. (2004a, 2004b) ise permeable kriyoprotektanlar kullanmadan memeli spermasını başarılı bir şekilde vitrifiye etmeyi başarmışlardır. Pradice ve ark. (2017) ise 100 mM sükröz ekleyerek konvansiyonel ve vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan epididimal teke spermasından çözündürme sonrası konvansiyonel dondurma yönteminde %45,0±6,0 spermatozoa motilitesi elde ederlerken,

vitrifikasyon sonrası %33,9±6,2 olarak bildirmişlerdir. Vitrifiye teke spermasından elde ettikleri spermatozoa motilite değerleri var olan çalışmadan oldukça yüksek olarak bulunmuştur. Ayrıca bizim çalışmamızdan farklı olarak köpeklerden ve balıklardan elde edilen vitrifiye edilmiş spermalarla da tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir (Merino ve ark. 2011, Sánchez ve ark. 2011). Vitrifiye edilmiş köpek spermasından elde edilen spermatozoa motilitesi %42,5±2,3 olup var olan çalışmadan elde edilen değerlerden oldukça yüksektir (Sanchez ve ark. 2011). Ayrıca Isachenko ve ark. (2008) tarafından bildirilen değerlere (%45–%57 hareketlilik) benzer olarak, Merino ve ark. (2011) kriyoprotektanlar olmadan küre yöntemi kullanılarak vitrifiye edilen ve 37°C'de çözündürülen balık sperması numunelerinde maksimum %85,7 spermatozoa motilitesi elde etmişlerdir. Var olan çalışmada ise vitrifikasyon sonrası en yüksek motilite değeri %2,17±,4 olup 0.25 M sükröz eklendiğinde ulaşılmıştır. Vitrifiye çözündürülmüş teke numunelerinde elde edilen sperma motilitesi Arandoa ve ark. (2017) tarafından rapor edilenlerden daha düşük, Jiménez-Rabadán ve ark. (2015) tarafından rapor edilenlerden daha yüksek bulunmuştur. Arandoa ve ark. (2017) tarafından vitrifikasyon sonrası koç spermasında en yüksek motilite (%8,4) değerlerine %2 BSA ile sulandırılmış spermaya 0.4 M sükröz eklendiğinde ulaşılmıştır. Jiménez-Rabadán ve ark. (2015) ise gliserol ve sükröz içeren payetlerde vitrifiye edilen koç spermatozoasında %0±0,73 motilite bildirmişlerdir. Arraztoa ve ark. (2016) ise %4 dimethylformamide ve %4 gliserol kullanarak küre yöntemi ile vitrifiye edilen domuz spermasında vitrifikasyon sonrasında hareketli spermatozoa elde etmemişlerdir. Kriyoprotektan olarak hücresel strese karşı ozmotik bir tampon görevi gören sukroz kullanıldığında, sperm hücrelerinin hareketliliğinde belirgin bir azalma olmaktadır ve bu kadar düşük motilitenin nedeni hala bilinmemektedir. Disakkaritlerin varlığında glikoz taşınmasının engellendiği iyi bilinmektedir. Daha yüksek moleküler ağırlığa ve daha düşük geçirgenliğe sahip olan sükröz ve trehaloz gibi disakkaritlerin plazma zarlarını kolayca geçemedikleri göz önüne alındığında, bir enerji kaynağı olarak sınırlı kalabilmektedirler. Disakkarit içeren sulandırıcılardaki spermatozoa, glikoz veya fruktoz içeren sulandırıcılara göre, çözündürme sonrası hareketliliğini daha hızlı kaybettiğinden belki de monosakkaritler spermatozoa tarafından daha kolay metabolize edilebilmektedir (Caturra-Sanchez ve ark. 2018). Ayrıca vitrifikasyon işlemi sonrası sperm hücrelerinin hareketliliğindeki değişiklikler mitokondriyal membran potansiyelindeki değişikliklere bağlı olabilir (Barbosa ve ark. 2023). Spermatozoalar sperm membran bütünlüğüne sahip oldukları zaman motil ve canlı olarak kabul edilirler (Le ve ark. 2019). Plazma zarındaki yağ asitlerinin peroksidasyonu da sperm morfolojisini bozar ve sperm motilitesinde azalmaya yol açar (Tamburrino ve ark. 2023). Jiménez-Rabadán ve ark. (2015) ise

vitrikiye koç spermasında spermatoza canlılığını  $0,24 \pm 2,95$  ile  $1,29 \pm 2,95$  (ortalama  $\pm$  SE) arasında olduğunu bildirmişlerdir. Arraztoa ve ark. (2016) tarafından da dimetilsulfoksit ile vitrikiye edilen domuz spermatozoasında çözüm sonu canlılık oranı %0-2 arasında olup benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da vitrikiye edilen teke spermasındaki başarı oranı çok düşük olmakla beraber en iyi sonuç kriyopektan olarak 0.25 M sükröz çözeltisi kullanıldığında elde edilmiştir. Vitrikiye çözdürülmüş teke spermasından elde edilen spermatozoa canlılığı Jiménez-Rabadán ve ark. (2015) ve Arraztoa ve ark. (2016) tarafından rapor edilenlerle benzerlik göstermekle beraber, Sanchez ve ark. (2011) ise köpek spermasının vitrifikasyon için farklı konsantrasyonlarda (0.1 M, 0.25 M ve 0.4 M) sükröz ilavesinden sonra spermatozoa canlılığı bakımından gruplar arası bir fark bulmamışlardır ve elde edilen değerler var olan çalışmadan oldukça yüksek bulunmuştur (Sanchez ve ark 2011). Bununla birlikte Araonda ve ark. (2017) sperma örneklerinin vitrifikasyon işleminden önce 2 saat kadar 5°C'de tutulmasının sperm kalitesinin artırılmasına yardımcı olabileceğini rapor etmişlerdir. Vitrifikasyon işlemi öncesinde soğutulmuş sperma örneklerine kriyopektan olarak 0.6 M sükröz çözeltisi kullandıklarında, gruplar arasında sperm membran bütünlüğü bakımından önemli ( $p \leq 0,05$ ) bir fark bulunurken, elde edilen değerler var olan çalışmadan yüksek bulunmuştur. Bu bağlamda hiperozmotik solüsyonlara (vitrifikasyonda kullanılan benzer) maruz bırakılan spermanın, düşük sıcaklıklarda muhafaza edildiğinde daha az spermolize uğrayabileceği ileri sürülmüştür (Gao ve ark. 1993). Olamitibo ve ark. (2016) ise farklı tris bazlı sulandırıcılara %20 oranında avokado çekirdeği ekstratının katılması ile vitrikiye edilen Batı Afrika Cücesi tekelerinden elde edilen spermatozoa kalitesini suni tohumlama programı için tatmin edici olduğunu rapor etmişlerdir. Spermatozoa motilitesi %35'den fazla elde edilirken spermatozoa canlılığı ise %55'ten yukarı değerler bulunmuş olup, elde edilen değerler var olan çalışmanın bulgularından oldukça yüksek bulunmuştur. Yazarlar avocado içeriğinin hücre fonksiyonlarında gerekli olan bazı mineralleri, lutein ve antioksidanları içermesinden dolayı vitrifasyondan başarılı sonuçlar aldıklarını ileri sürmüşlerdir (Olamitibo ve ark. 2016). Tavşan (Rosato ve ark. 2013) ve kanguru (McClean ve ark. 2008) spermaları da vitrikiye edilmeye çalışılmış ancak çözdürme sonrası çok az sayıda hareketli ve canlı hücre tespit edilmiştir. Ayrıca var olan çalışmada Jiménez-Rabadán ve ark. (2015)'nin belirttiği gibi sperm morfolojisi de vitrifikasyon işleminden negatif etkilenmiştir. Vitrifikasyon sonrası en yüksek sperm morfolojisi 0.1 M sukroz eklenmesi ile elde edilirken en iyi sonuç 0.25 M sükröz elde edilmesi ile bulunmuştur. Arandoa ve ark. (2017) ise farklı sükröz dozlarının eklenmesi ile vitrifikasyon sonrası gruplar arasında morfolojisi bakımından herhangi bir fark tespit etmemişlerdir.

Çalışmalar arası elde edilen spermatolojik farklılıklar vitrifikasyon için kullanılan kriyopektanlara özgü ozmotik değişikliklerle açıklanabilir (Agha-Rahimi ve ark. 2014). Ayrıca vitrifikasyondaki başarı, yukarıda bahsedilen bulgular eşliğinde vitrifikasyona karşı spermatozoa duyarlılığının olması türe bağlı olabilir ve spermatozoon başının boyutu veya şekli kriyodirençte rol oynayabilir (Arandoa ve ark. 2017). Spermatozoon başının şekli ve boyutu, hücrenin kriyosensivitesini tanımlayan faktörlerdendir. Bazı türlerde başın küçük boyutta olması daha yüksek kriyodirenç ile ilişkilendirilmiştir (Jiménez-Rabadán ve ark. 2015). Bu nedenle, insan spermatozoasının vitrifikasyona karşı daha yüksek kriyodirenci diğer türlere göre daha küçük ve yapısal olarak kompakt bir spermatozoon başına sahip olduğundan, teke, tavşan ve domuz gibi diğer memeli türlerinde görülen ultra hızlı soğumanın neden olduğu kriyohasara karşı daha az savunmasızdır (Arraztoa ve ark 2016; Isachenko ve ark 2004b; Nawroth ve ark. 2002). Olumlu sonuç alınmaması sadece spermatozoanın yapısal bileşimine değil aynı zamanda sperma alma yöntemi, vitrifikasyon prosedürünün soğutma ve çözdürme hızı gibi dikkate alınmayan diğer faktörlerden de kaynaklanıyor olabilir (Rosato ve Iaffaldano ark. 2013). Hücre dışı buz oluşumunun olmamasının koşulu yüksek hızdır, ancak ortamın yüksek viskozitesi ve non-permeable kriyoprotektanların optimal konsantrasyonu da başarılı vitrifikasyon için önemli bir faktördür (Agha-Rahimi ve ark. 2014; Barbosa ve ark. 2023). Soğutma ve çözdürme oranları, sperm kriyohasara boyutunu belirlemede kritik faktörlerdir (Agha-Rahimi ve ark. 2014). Aslında, soğutma ve çözdürme işlemleri sırasındaki problem, hücrelerin soğutma sırasında iki kez ve çözdürme sırasında bir kez geçmek zorunda olduğu ara sıcaklık (-10 ila -60 °C) ile yakından ilişkili olan öldürücülüktür. Spermatozoa için ölümcül olan ısı (-15 -5) aralığı, vitrifikasyon metodu ile hızla geçildiğinden buz kristal oluşum şansını azaltırken, konvansiyonel dondurma yönteminde hücreler bu öldürücü ısıya dondurma ve çözdürme süresince iki kez maruz kalmaktadır (Antonov, A ve Ivanova 2023; Peirouvi ve ark. 2007). Vitrifikasyon işlemi kriyoprotektan madde antifriz gibi etki ederek donma ısısını düşürmektedir. Amaç soğutma esnasında giderek yükselen viskozite artışı ile buz çekirdeği oluşması ve büyümesinin önlenmesidir (Kervancıoğlu 2018). Yumurta sarısı ise genellikle sperma sulandırıcılarına permeable olmayan kriyokoruyucu olarak dahil edilmektedir (Zakošek ve ark. 2020). Maxwell ve Jonhson (1997) yumurta sarısının sulandırılmış spermatozoaya katılarak bir miktar koruma sağlayabileceğini bildirmiştir. Fakat teke spermasında bulunan seminal plazma ile yumurta sarısında bulunan fosfolipaz A enzimi arasındaki toksik etkileşim nedeniyle yumurta sarısının uzaklaştırılması gereklidir. Ayrıca yumurta sarısı kullanılmasını sınırlayan ve farklı araştırma grupları arasında farklı sonuçlara yol açan asıl nedenin yumurta sarısındaki tanımlanmamış bileşenlerin

olduğunun bilinmesidir. Ayrıca yumurta sarısı hayvansal kökenli olduğundan potansiyel bakteriyel kontaminasyonu ve hastalık bulaştırma riski olabileceğinden son yıllarda hayvansal kaynaklı kriyoprotektanların kullanımından kaçınmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Arandoa ve ark. 2017). Vitrifikasyon yönteminin getirdiği faydalardan biri de buz kristallerinin oluşumunu önlenmesi yanında yumurta sarısının ve gliserolün neden olduğu olumsuz etkilerden kaçınmaktır (Lv ve ark. 2019). Gliserol de spermatozoanın kriyotoleransını artırmasına rağmen, aynı zamanda spermatozoa üzerinde potansiyel toksik ve ozmotik stres üretir (Arandoa ve ark. 2017; Lv ve ark. 2019). Jiménez-Rabadán ve ark. (2015)'nin yaptığı bir çalışmada koç spermalarını vitrifiye etmek için 0.03 M sükröz-%3 gliserol ve 0.05 M sükröz-%7 gliserol kombinasyonlarına dayalı sulandırıcılara yumurta sarısının eklenmesi ile vitrifikasyon yöntemine spermatozoanın zayıf tolerans gösterdiğini belirterek olumlu sonuç alamamışlardır. Fakat sükrözün koç spermalarını vitrifiye etmek için potansiyel bir kriyoprotektan görevi görebileceğini rapor etmişlerdir. Domuzlarda da kriyoprotektan olarak gliserol kullanıldığında canlı hücre elde edilmemesine rağmen, gliserol kullanılması spermatozoanın DNA bütünlüğünü etkilememiştir. Rosato ve Iaffaldano (2013) tarafından tavşan spermalarının vitrifikasyonundan sonra sağlam DNA'ya sahip spermatozoa oranı ortalama  $94,5 \pm 1,4$  olmakla beraber domuz spermalarının vitrifikasyonu sonucu elde edilen değerlere benzer sonuçlar rapor etmişlerdir. Elde edilen değerler Isachenko ve ark. (2004a,b), Jiménez-Rabadán ve ark. (2015) ve Arandoa ve ark. (2017)'nin bulguları ile de paralellik göstermiştir. Köpeklerde vitrifikasyon sulandırıcısına 0.25 M sükröz eklenmesi ile vitrifikasyon sonrası ( $2,8 \pm 0,5$ ) spermatozoa DNA fragmentasyon oranı kontrole ( $5,6 \pm 0,6$ ) göre önemli ölçüde azalmakla beraber daha düşük konsantrasyonlarda (0.1 M) veya daha yüksek konsantrasyonlarda (0.4 M) sükröz eklenmesinin vitrifikasyon sonrası DNA fragmentasyon oranını önemli ölçüde değiştirmemiştir. Satirapod ve ark. (2012)'de vitrifikasyonun hızlı dondurmaya göre daha az spermatozoa DNA hasarına neden olduğu yönünde benzer sonuçlar bildirmişlerdir. Bu yazarlara göre, kriyoprezervasyon sonrası meydana gelen DNA hasarının buz kristali oluşumuna bağlı mekanik yaralanmalardan ve oksidatif stres bağlı olarak meydana geldiği bildirilmiştir (Agha-Rahimi ve ark. 2014; Tamburrino ve ark. 2023). Var olan çalışmada da DNA fragmentasyon oranı en yüksek 0.5 M sükröz eklenmesi ile görülürken en düşük DNA fragmentasyon oranı 0.1 M sükröz eklenmesi ile elde edilmiştir. Birçok yazar, DNA hasarının, kullanılan kriyoprotektanların moleküler ağırlığı, yapısı, konsantrasyonu, kimyasal özellikleri ve kriyoprezervasyon protokolü ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir ve bu nedenle her sperma türü için en

iyi eşleşmeyi bulmak amacıyla farklı kombinasyonlar kullanılarak tekrar test edilmelidir (Arandoa ve ark. 2017).

## SONUÇ

Vitrifiye edilen teke spermasından elde sonuçlardan suni tohumlamada kullanım için yetersiz değerler elde edilse de, non-permeable bir kriyoprotektan olan sükrözün DNA bütünlüğünü etkili bir şekilde koruyabilmesinden dolayı intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gibi teknolojik yöntemlerin kullanımı ile bu handikapın üstesinden gelinebilir. Vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmuş spermanın canlılığı zayıf veya tamamen kaybolmuş olsa bile, ICSI performansı sırasında spermatozoa kuyruklu mikromanipulator ile kırıldığından dolayı ICSI'nin başarısı için spermatozoanın yapısal bütünlüğü kritik bir öneme sahip değildir. Bu nedenle, küçük ruminant spermasının vitrifikasyonu ile ilgili çalışmalar halen anlam taşımaktadır. Vitrifikasyondan sonra en iyi sperma kalitesini elde etmek amacıyla sperma vitrifikasyonu için en iyi kriyopektan maddeyi ve vitrifikasyon metodunun uygun yönetimini aydınlatmak için daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.

**Conflict of interest:** The authors have no conflicts of interest to report.

**Authors' Contributions:** CC and RF contributed to the project idea, design and execution of the study. CC and RF contributed to the acquisition of data. CC and RF analysed the data. CC and RF drafted and wrote the manuscript. CC and RF reviewed the manuscript critically. All authors have read and approved the finalized manuscript.

**Ethical approval:** This study was carried out at Harran University Reserch Animals Application Center. This research was approved by The Ethics Committee of Dollvet Veteriner Aşı İlaç Biyolojik Madde Üretim Sanayi ve Ticaret A.Ş. (DOLLVET-HADYEK), (Tarih: 02/2015). 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.

**Acknowledgement:** In this study would like to thank the Harran University Scientific Research Projects Coordinatorship (HÜBAP) with the study entitled "Teke spermalarının vitrifikasyonu", Project No: 1609, for their contributions to the present study and also thank the administration and staff of the Harran University Reserch Animals Application Center.

**Explanation:** We have no presented as a oral, poster, abstract vs.



## KAYNAKLAR

- Agha-Rahimi, A., Khalili, M.A., Nabi, A., & Ashourzadeh S. (2014). Vitrification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding. *Reprod. Biomed*, 26, 352-358.
- Antonov, A., & Ivanova, B. (2023). Canine sperm vitrification with nonpermeable cryoprotectants and coconut water extender. *Anim Reprod*, 23, 20(2), e20230004. doi: 10.1590/1984-3143-AR2023-0004.
- Arandoa, A., Gonzalezb, A., Delgadoa, J.V., Arrebolac, F.A., & Perez-Marín, C.C. (2017). Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. *Animal Reproduction Science*, 181, 175-185. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.04.008.
- Arraztoa, C.C., Miragaya, M.H., Chaves, M.G., Trasorras, V.L., Gambarotta, M.C., & Neild, D.M. (2017). Porcine sperm vitrification II: Spheres method. *Andrologia*, 49(8), 1-8. [https://doi: 10.1111/and.12738](https://doi.org/10.1111/and.12738).
- Barbosa, B.B., Evangelista, I.T.A., Soares, A.R.B., Leão, D.L., Pereira, R.J.G., & Domingues, S.F.S. (2023). Kinetic vitrification: concepts and perspectives in animal sperm cryopreservation. *Anim Reprod*, 22, 20(2):e20220096. doi: 10.1590/1984-3143.
- Caturla-Sanchez, E., Sanchez-Calabuig, M., Perez-Gutierrez, J., Cerdeira, J., Castano, C., & Santiago-Moreno, J. (2018). Vitrification of dog spermatozoa: Effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures. *Cryobiology*, 80, 126. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.11.001.
- Cebi Sen, C., Yumusak, N., Atilgan, H.I., Sadic, M., Koca, G., & Korkmaz, M. (2018). The protective effect of melatonin on sperm quality in rat after radioiodine treatment. *Andrologia*, 50, 1-7. [https://doi: 10.1111/and.12962](https://doi.org/10.1111/and.12962).
- Fahy, G.M., & Rall, W.F. (2007). Vitrification: an overview. In Tucker MJ, Liebermann J, eds. *Vitrification in Assisted Reproduction. A User's Manual and Troublr-Shooting Guide*. London: Informa Healthcare, 1-20.
- Gao, D.Y., Ashworth, E., Watson, S.P.F., Kleinhans, F.W., Mazur, P., & Critser, J.K. (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod*, 49, 112-123.
- Gharajelar, S.N., Sadrkhanloo, R.A., Onori, M., & Saberivand, A. (2016). A comparative study on the effects of different cryoprotectants on the quality of canine sperm during vitrification process. *Vet Res Forum*, 7(3), 235-239.
- Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, I.I., Montag, M., Dessole, S., Nawroth, F., & Van DerVen, H. (2004a). Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility DNA integrity, and fertilization ability. *Biol Reprod*, 71, 1167-1173.
- Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, I.I., Rahimi, G., Schondorf, T., Mallmann, P., Dessole, S., & Nawroth, F. (2004b). DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod*, 19, 932-939.
- Isachenko, E., Isachenko, V., Weis, J.M., Kreienberg, R., Katkov, I.I., Schulz, M., Lulat, A.G.M.I., Risopatrón, M.J., & Sánchez, R. (2008). Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Soc Reprod Fertil*, 136, 167-173.
- Isachenko, V., Maettner, R., Petrunkina, A.M., Sterzik, K., Mallmann, P., Rahimi, G., Sanchez, R., Risopatrón, J., Damjanoski, I., & Isachenko, E. (2012). Vitrification of Human ICSI/IVF Spermatozoa Without Cryoprotectants: New Capillary Technology. *Journal of Andrology*, 33, 462-468.
- Jiménez-Rabadán, P., García-Álvarez, O., Vidal, A., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Ramón, M., Del Olmo, E., Fernández-Santos, R., Garde, J.J., & Soler, A.J. (2015). Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology*, 71, 85-90.
- Kervancıoğlu, G. (2018). Kanser Hastalarında Fertilitenin Korunmasında Kullanılan Kriyoprezervasyon Yöntemleri. *Tıp Fakültesi Klinikleri*, 1(2), 17-26.
- Koshimoto, C.H., & Mazur, P. (2002). Effects of cooling and warming rate to and from )70 °C, and effect of further cooling from )70 to )196°C on the motility of mouse spermatozoa. *Biol Reprod*, 66, 1477-1484.
- Kulaksiz, R., & Daşkın, A. (2009). Farklı antioksidanlarla dondurulan Saanen teke spermasının in vitro ve in vitro değerlendirilmesi. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 56, 201-205.
- Le, M.T., Nguyen, T.T.T., Nguyen, T.T., Nguyen, V.T., Nguyen, T.T.A., Nguyen, V.Q.H., & Cao, N.T. (2019). Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: Effects on motility, viability, morphology and cellular defects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 234, 14–20. doi:10.1016/j.ejogrb.2019.01.001
- Liu, J., Tanrikut, C., Wright, D.L., Lee, G.Y., Toner, M., Biggers, J.D., & Toth, T.L. (2016). Cryopreservation of human spermatozoa with minimal non-permeable cryoprotectant. *Cryobiology*, 73(2), 162-170.
- Lv, C., Wu, G., Hong, Q., Quan, G. (2019). Spermatozoa Cryopreservation: State of Art and Future in Small Ruminants. *Biopreservation And Biobanking*, 17(2), 171-182.
- Maxwell, W.M.C., Welch, G.R., & Johnson, L.A. (1997). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*, 8, 1165-1178.
- McClellan, R., Holt, W.V., Zee, Y.P., Lisle, A., & Johnston, S.D. (2008). The effect of cryoprotectant on kangaroo sperm ultrastructure and mitochondrial function. *Cryobiology*, 57, 297-303.
- Merino, O., Risopatrón, J., Sánchez, R., Isachenko, E., Figueroa, E., Valdebenito, I., & Isachenko, V. (2011). Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. *Anim. Reprod. Sci*, 124, 125-131.
- Mukaida, T., Wada, S., Takahashi, K., Pedro, P.B., An, T.Z., & Kasai, M. (1998). Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell embryos. *Hum Reprod*, 2874-2879.
- Nawroth, F., Isachenko, V., Dessole, S., Rahimi, G., Farina, M., Vargiu, N., Mallmann, P., Dattena, M., Capobianco, G., Peters, D., Orth, I., & Isachenko, E. (2002). Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryo Lett*, 23, 93-102.
- Olamitibo, D.J., Dayo, O.O., Oladimeji, A.M., Mathew, A., Olajide, O., Emmanuel, O.O., Oluwafemi, A.E., Amidu, S.T., & Ayobami, I.O. (2016). Effects of avocado seed extract in different trisextenders on sperm and oxidative stress indices of vitrified goat spermatozoa. *Journal of agricultural sciences*, 61(4), 359-374.

- Ömür, A.D., & Çoyan, K. (2014).** Sezon İçi ve Sezon Dışında Koç Spermasının Dondurulmasında Antioksidanların Etkisi. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 11(1), 37-42.
- Peirouvi, T., Farjah, G., Rad, J.S., & Novin, M.G. (2007).** Vitrification induced apoptosis in spermatozoa from fertile and subfertile men. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 5(3),117-120.
- Pradiee J., Sanchez-Calabuig M.J., Castano C., O'Brien E., Estes M.C., Beltran-Brena P., Maillo V., Santiago-Moreno J., & Rizos D. (2017).** Fertilizing capacity of vitrified epididymal sperm from Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology*, 108(2018), 314-320.
- Rosato M.P., & Iaffaldano N. (2013).** Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, 73, 508-516.
- Sánchez, R., Risopatrón, J., Schulz, M., Villegas, J., Isachenko, V., Kreinberg, R., & Isachenko, E. (2011).** Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia*, 43, 233-241.
- Satirapod, C., Treetampinich, C., Weerakiet, S., Wongkularb, A., Rattanasiri, S., & Choktanasiri, W. (2012).** Comparison of cryopreserved human sperm from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: On motility, morphology, vitality and DNA integrity. *Andrologia*, 44, 786-790. doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.01267.x
- Schulz, M., Munoz, M., Risopatron, J., & Sanchez, R. (2006):** Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification. *International Journal of Morphology*, 24-31.
- Shah D, Rasappan, Shila, & Karthik G. (2019).** A simple method of human sperm vitrification. *MethodsX*, 6, 2198-2204.
- Tamburrino, L., Traini, G., Marcellini, A., Vignozzi, L., Baldi, E., & Marchiani, S. (2023).** Cryopreservation of Human Spermatozoa: Functional, Molecular and Clinical Aspects. *Int J Mol Sci*, 28, 24(5), 4656. doi: 10.3390/ijms24054656.
- Tunalı G. (2014).** Sperm kriyoprezervasyon teknikleri ve fertilizasyon başarısındaki rolü. *Androloji Bülteni*, 57, 123-128.
- Van der Horst, G., & Maree, L. (2010).** SpermBlue®: A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis, *Biotechnic & Histochemistry*, 84(6), 299-308.
- Vajta, G., & Nagy, Z.P. (2006).** Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*, 779-796.
- Wetzels, A.M.M., Bras, M., Lens, J.W., Piederiet, M.H., Rijnders, P.M., Zeilmaker, G.H. (1996).** Laboratory aspects of in vitro fertilization. *Cryopreservation/Theory*, 229-244.
- Zakošek, P.M., Casal, M.L., Šterbenc, N., Virant, K.I., & Mrkun, J. (2020).** Vitrification Using Soy Lecithin and Sucrose: A New Way to Store the Sperm for the Preservation of Canine Reproductive Function *Animals*, 10(4), 653. doi.org/10.3390/ani10040653

## Comparison of Hen Performance and Mortality of Commercial Layer Flocks by Strain and Cage Type

Sema KABA<sup>1</sup>, Zehra BOZKURT<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Ali Çetinkaya Neighborhood, 1305 Street, No:10/1, Apartment:3, Afyonkarahisar, Türkiye

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Husbandry, 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

### ABSTRACT

The study aimed to compare the effects of strain and cage type on egg production, mortality and the rates of dirty eggs and broken eggs in commercial flocks of laying hens. The study was conducted on four commercial flocks of layers in medium-sized poultry farms in the city of Afyonkarahisar. Two white (Hy-Line and Super Nick) and two brown (Nick Brown) layer flocks were housed in conventional cages and enrichable cages. The laying flocks were visited weekly, and the egg production and the number of dead birds, dirty eggs, and broken eggs were collected on a daily basis from flock records between 19 and 56 weeks of age. Both strain and cage type had a significant effect on hen-day and hen-housed egg production. The brown strains (2.74%) and hens housed in conventional cages (2.61%) had higher mean egg production. The effect of strain on weekly mortality became insignificant after 32 weeks of age, while the highest mortality rates were observed in the enrichable cages. The weekly rates of dirty eggs and broken eggs showed significant differences between the groups of strains and cage type. The effects of strain x cage type interactions on egg production and on the rates of dirty eggs and broken eggs were found to be significant. White and brown laying hens in conventional cages had higher egg production than the hens kept in enrichable cages. In conclusion, brown strains had higher egg production than white strains and enrichable cages had lower egg production and higher mortality, as well as dirty and broken eggs.

**Key Words:** Cage type, Dirty and broken eggs, Egg production, Mortality, Strain

\*\*\*

## Genotip ve Kafes Tipine Göre Ticari Yumurtacı Sürülerde Tavuk Performansı ve Ölüm Oranlarının Karşılaştırılması

### ÖZ

Bu çalışmada ticari yumurtacı tavuk sürülerinde genotip ve kafes tipinin yumurta verimi, ölüm oranı ile kirli ve kırık yumurta oranları üzerine etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Araştırma Afyonkarahisar'daki orta ölçekli kanatlı işletmelerinde bulunan dört ticari yumurtacı tavuk sürüsünde yürütülmüştür. İki beyaz (Hy-line ve Super Nick) ve iki kahverengi (Nick Brown) yumurtacı sürü geleneksel ve zenginleştirilebilir kafeslerde barındırılmıştır. Yumurtacı sürüler 19-56 haftalık yaş döneminde haftalık olarak ziyaret edilmiş ve günlük yumurta üretimi, ölen tavuk sayısı ile kirli ve kırık yumurta sayıları çiftlik kayıtlarından toplanmıştır. Genotip ve kafes tipi tavuk-gün ve tavuk-kümes (%) yumurta üretimini önemli ölçüde etkilemiştir. Kahverengi genotiplerin (%2.74) ve geleneksel kafeslerde barındırılan tavukların (%2.61) ortalama yumurta üretimi daha yüksek bulunmuştur. En yüksek ölüm oranları zenginleştirilebilir kafeslerde gözlenirken 32 haftalık yaştan sonra genotipin haftalık ölüm oranlarına etkisi önemsiz hale gelmiştir. Haftalık kirli ve kırık yumurta oranları genotip ve kafes tipi grupları arasında önemli derecede farklılık göstermiştir. Genotip x kafes tipi etkileşimlerinin yumurta üretimi, kirli ve kırık yumurta oranlarına etkisi önemli bulunmuştur. Zenginleştirilebilir kafeslerde barındırılanlara göre geleneksel kafeslerdeki beyaz ve kahverengi yumurtacı tavukların yumurta üretimi daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, kahverengi genotiplerin beyaz genotiplere göre önemli derecede daha yüksek yumurta üretimine sahip olduğu, zenginleştirilebilir kafeslerde barındırılan tavukların yumurta üretiminin daha düşük, ölüm oranı ile kirli ve kırık yumurta oranlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Genotip, Kafes tipi, Kirli ve kırık yumurta, Ölüm oranı, Yumurta üretimi

To cite this article: Kaba S, Bozkurt Z. Comparison of Hen Performance and Mortality of Commercial Layer Flocks by Strain and Cage Type. (2023) 16(4):530-540

Submission: 04.09.2023 Accepted: 21.11.2023 Published Online: 12.12.2023

ORCID ID; SK: 0009-0008-7402-51277 ZB: 0000-0001-8272-7817

\*Corresponding author e-mail: [zhra.bozkurt@gmail.com](mailto:zhra.bozkurt@gmail.com)

The paper is part of the first author's master's thesis (Thesis no:2019-040) produced in Afyon Kocatepe University

## INTRODUCTION

Following the Brambell Committee Report in 1965, which reported that intensive cage systems severely restricted hen behaviour and compromised welfare, research into alternative systems began to gather pace (Singh et al. 2009). In this context, there has been a growing momentum towards animal-friendly and environmentally sustainable approaches, reaching far beyond Europe. Concerns regarding the well-being of laying hens have prompted a widespread industry pursuit of improved housing systems (Tactacan et al. 2009). However, the results of research into animal health and welfare (animal diseases, aggressive pecking, biosecurity etc.), egg production (costs, economic returns, high labour requirements etc.) and the environmental impact of the industry (ammonia emissions, pollution etc.) have increased the interest in the alternative systems (Tactacan et al. 2009; Xin et al. 2011; David et al. 2015). Furthermore, it remains a controversial issue with no consensus among researchers on the extent to which different housing systems affect hen performance, including economic parameters such as liveability, egg production and egg quality (Fulton 2017). Efforts are ongoing to develop better housing systems for hens (Tactacan et al. 2009). The health and welfare of the birds should be balanced with consumer preferences and the needs and environmental impacts of the industry when designing alternative housing systems for laying hens. In addition, strain x environment interactions should be considered when developing poultry housing systems (Singh et al. 2009).

Intensive selection and crossbreeding of pure lines has increased egg production while significantly reducing mortality and the incidence of egg defects through high standards of care and feeding. However, dirty and broken or cracked defective eggs remain a problem in commercial laying flocks used today, affecting both the economic performance of the flock

and food quality, and posing a challenge to the egg processing industry (Ledvinka et al. 2012; Wolc et al. 2012; Hamilton and Bryden 2021).

Research is being conducted on alternative housing systems to conventional cages for laying hens, including enrichable (Alig et al. 2023) and enriched cages (Pavlik et al. 2008; Tactacan et al. 2009), and free-range systems (Ledvinka et al. 2012; Freire and Cowling 2013). The decision on which housing system is best for laying hens is based on evaluations of animal welfare status, economic factors, and food safety indices (Ledvinka et al. 2012). Enrichable colony cages are enriched cages that contain no equipment other than feeders and drinkers (Heflin et al. 2018; Ortiz et al. 2021; Alig et al. 2023). These cages can be converted to enriched cages at any time or used as a permanent housing system when there is no market or regulatory pressure. However, there is limited or no research on the effects of enrichable cages on hen performance and mortality. In addition, according to the results of controlled laboratory studies, the results of research on commercial laying hen flocks under on-farm conditions may be more useful for sector-specific assessments and the development of new strategies.

The aim of this study was to compare the effect of strain and cage type on egg production, the rates of dirty and broken eggs and mortality in commercial layer flocks.

## MATERIALS and METHODS

### Information on Laying Hen Flocks and Bird Management

The study was conducted on four commercial laying hen flocks from 18 to 56 weeks of age. These flocks belonged to medium-scale egg production farms located in Susuz and Çukurköy villages in the central districts of Afyonkarahisar. Collaboration was established with these farms after explaining the

purpose, needs and implementation of the research. The research began with four 18-week-old flocks raised in rearing cages. Hy-Line W-80 (white) and Nick Brown (brown) pullets were housed in enrichable cages, while Super Nick (white) and Nick Brown (brown) pullets were housed in conventional cages. Table 1 provides information on housing condition of the laying hens, cage characteristics, and the commercial layer flocks used in the research. The conventional cages housed 8 or 9 hens per cage in an area of 3249 cm<sup>2</sup> while the enrichable cages housed 18 or 19 hens per cage in an area of 7200 cm<sup>2</sup>. The bird cages were with multiple tiers and levels. A linear feeder was used in front of every cage and on each level of the cages. In each cage, there were a minimum of two nipple drinkers. In the four laying houses, feeding, manure removal, egg collection, and ventilation were fully automated for the commercial flocks. In addition, the automatic ventilation system included cooling pads.

The laying hens were fed with standard layer diets prepared on the farms (15.8% protein, 2600 Kcal metabolic energy in brown strain diets and 16-17% protein, 2600-2840 Kcal metabolic energy in white strain diets). Automatic feeders and drinkers provided ad libitum access to feed and water for the hens. For lighting, 9-watt LED lamps were used, providing a photoperiod of 16.5 hours of light and 7.5 hours of darkness. The structure of the cage systems and the stocking densities within the cages were determined by the farms according to their own commercial and administrative policies. Farmers followed breeders' recommendations and guidelines for bird care and management (Hy-Line W-80 2016; Brown Nick 2016; Super Nick 2017). Beak trimming in chicks was performed by the Minimum Standards Related to the Protection of Laying Hens Regulation (Anonymous 2014). White and brown layer birds were vaccinated against potential disease risks including Newcastle Disease (ND), Infectious Bursal Disease (IBD),

Infectious Coryza (IC), Avian Encephalomyelitis (AE), Infectious Bronchitis (IB) Egg Drop Syndrome (EDS) and Pox. The study received ethical approval from the Local Animal Ethics Committee of Afyon Kocatepe University on June 20, 2017, with reference number AKUHADYEK-244-17.

### **Collection of the Research Data**

Eggs laid in each strain and cage type group were collected daily and the number of eggs, dead birds, and broken and dirty eggs were recorded daily by the farmers according to their routine flock management programme. Each flock was visited once at the beginning of the placement and at least once a week from 19 to 56 weeks of age period and data for this study were collected from daily flock records (Sherwin et al. 2010).

Hen-day egg production was calculated by dividing the number of eggs laid each day by the number of hens in the laying house on that day. Hen-housed egg production was determined by dividing the number of eggs laid each day by the total number of hens at the beginning of the laying period. The weekly rates of dirty and broken eggs were calculated by dividing the weekly cumulative number of dirty and broken eggs by the total number of eggs laid in that week. To determine the weekly mortality rate, the cumulative number of dead birds for each week was divided by the total number of birds present in the laying house at the beginning of that week (Yılmaz Dikmen et al. 2016).

### **Statistical Analysis**

Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to analyse the differences between the groups of strain and cage type groups for daily egg production (hen-day and hen-housed %), weekly rates of broken eggs, dirty eggs and mortality (%). The data obtained from the research were analyzed using the SPSS 21st

version for Windows. A significance level of  $P < 0.05$  was used.

**Table 1.** Information on housing conditions of the laying hens, cage characteristics and commercial layer flocks

Traits	Laying house 1	Laying house 2	Laying house 3	Laying house 4
Strain	Hy-Line	Nick Brown	Super Nick	Nick Brown
Egg shell colour	White	Brown	White	Brown
Type of colony cages	Enrichable	Enrichable	Conventional	Conventional
Cage dimensions (W × D × H cm)	120 x 60 x 60	120 x 60 x 60	57 x 57 x 45	57 x 57 x 45
Stocking density (birds/cage)	19	18	9	8
Poultry house floor area (m <sup>2</sup> )	700	800	540	600
Number of fans	14	14	8	6
Number of chimney	6	10	6	8
Number of windows	108	132	60	38
Numbers of lighting lamps	84	98	36	42

## RESULTS

The results regarding the impact of strain and cage type on hen-day and hen-housed egg production in commercial layer flocks are presented in Table 2. The effect of strain on egg production was significant ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ ) across all laying periods starting from 25 weeks of age, with brown strain hens showing higher egg production compared to white strain hens. Hen-day egg production was not influenced by cage type in periods 1 and 3, but in periods 2 and 4, hens housed in enrichable cages produced more eggs ( $P < 0.01$ ). Hen-housed egg production was significantly affected by strain and cage type up to 56 weeks of age ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ) except for period 1. Brown strain hens had higher hen-housed egg production than white strain laying hens. The hen-housed egg production was higher in the brown strains and conventional cage groups over the entire laying period (19-56 weeks) ( $P < 0.05$ ). Significant interactions between strain and cage type were found for the hen-day and hen-housed egg production ( $P < 0.001$ ) between 25-56 weeks of age. The impact of strain and cage type on the weekly mortality rates of commercial flocks of laying hens are presented in Table 3. The mortality rate was

significantly influenced by strain and the strain x cage type interaction only in laying periods 1 and 2 ( $P < 0.001$ ). However, the cage type affected mortality in all periods up to 56 weeks of age ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). Higher mortality rates were observed in commercial brown layer flocks up to week 32. In general, the effect of strain on mortality was insignificant over the period 19-56 weeks. Throughout the egg production period in which the study was conducted, higher mortality was observed in flocks housed in enrichable cages.

The results regarding the impact of strain and cage type on weekly dirty and broken egg rates are given in Table 4. The rate of dirty eggs was significantly influenced by the strain in all periods up to 56 weeks of age ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ), and it was significantly influenced by the cage type between 25 to 56 weeks ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ ). Broken egg rate was significantly influenced by strain in periods 25-32, 45-56 and 19-56 weeks of age ( $P < 0.001$ ) and by cage type in all laying periods after 25 weeks of age ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). The strain x cage type interaction was significant for dirty eggs at 25-32, 33-44, 45-56 and 19-56 weeks ( $P < 0.001$ ) and for broken eggs at 33-44, 45-56 and 19-56 weeks ( $P < 0.05$  and  $P < 0.001$ ).



**Table 2.** The impact of strain and cage type on hen-day and hen-housed egg production (%) in commercial layer flocks

		Laying periods														
		1 ( $\leq 24$ wks)			2 (25-32 wks)			3 (33-44 wks)			4 (45-56 wks)			19-56 wks		
		HD		HH	HD		HH	HD		HH	HD		HH	HD	HH	
Strain	Cage type	n	Mean	Mean	n	Mean	Mean	n	Mean	Mean	n	Mean	Mean	n	Mean	Mean
White		80	44.008	43.912	112	84.151	83.178	168	86.674	82.483	162	86.404	79.960	522	79.510	75.938
Brown		84	45.105	44.827	112	91.730	89.789	169	88.165	84.098	177	89.158	82.547	542	82.553	78.681
	Conventional	80	45.506	45.383	112	86.318	85.349	169	87.379	85.280	161	87.081	83.631	522	80.642	78.672
	Enrichable	84	43.678	43.426	112	89.563	87.619	168	87.465	81.294	178	88.530	79.212	542	81.462	76.048
ANOVA																
SEM			2.358	2.343		0.487	0.466		0.279	0.268		0.236	0.226		0.622	0.588
R <sup>2</sup>			0.004	0.005		0.382	0.382		0.100	0.222		0.174	0.333		0.008	0.012
<i>P value</i>																
Strain			0.809	0.839		0.000***	0.000***		0.008**	0.003**		0.000***	0.000***		0.014*	0.018*
Cage type			0.717	0.694		0.001**	0.016*		0.884	0.000***		0.001**	0.000***		0.494	0.028*
Strain x Cage type			0.472	0.459		0.000***	0.000***		0.000***	0.000***		0.000***	0.000***		0.193	0.095

\*:P<0.05, \*\*:P<0.01, \*\*\*:P<0.001, -: Non significant, **HD**: Hen-day egg production, **HH**: Hen-housed egg

**Table 3.** The impact of strain and cage type on weekly mortality rate (%) in commercial layer flocks

		Laying periods									
		1 (≤24 wks)		2 (25-32 wks)		3 (33-44 wks)		4 (45-56 wks)		19-56 wks	
Strain	Cage type	n	Mean	n	Mean	n	Mean	n	Mean	n	Mean
White		12	0.063	16	0.174	24	0.384	24	0.235	76	0.242
Brown		12	0.182	16	0.271	24	0.236	24	0.240	76	0.236
	Conventional	12	0.075	16	0.157	24	0.127	24	0.132	76	0.127
	Enrichable	12	0.171	16	0.287	24	0.493	24	0.343	76	0.351
ANOVA											
SEM		0.011		0.010		0.058		0.018		0.021	
R <sup>2</sup>		0.763		0.810		0.221		0.464		0.166	
<i>P value</i>											
Strain		0.000***		0.000***		0.210-		0.870-		0.891-	
Cage type		0.000***		0.000***		0.003**		0.000***		0.000***	
Strain x Cage type		0.000***		0.000***		0.343-		0.169-		0.596-	

\*\*: $P < 0.01$ , \*\*\*: $P < 0.001$ , -: Non significant

**Table 4.** The effects of strain and cage type on weekly dirty and broken egg rates (%) in commercial layer flocks

		Laying periods															
		1 (≤24 wks)			2 (25-32 wks)			3 (33-44 wks)			4 (45-56 wks)			19-56 wks			
Strain	Cage type	Dirty		Broken		Dirty		Broken		Dirty		Broken		Dirty		Broken	
		n	Mean	Mean	n	Mean	Mean	n	Mean	Mean	n	Mean	Mean	n	Mean	Mean	
White		12	0.267	0.150	16	0.112	0.060	24	0.135	0.072	24	0.135	0.075	76	0.151	0.083	
Brown		12	0.087	0.074	16	0.071	0.046	24	0.075	0.059	24	0.065	0.047	76	0.073	0.055	
	Conventional Enrichable	12	0.187	0.123	16	0.061	0.033	24	0.083	0.052	24	0.076	0.046	76	0.093	0.057	
		12	0.168	0.101	16	0.122	0.072	24	0.126	0.079	24	0.123	0.077	76	0.131	0.080	
ANOVA																	
SEM			0.036	0.024		0.002	0.001		0.005	0.004		0.004	0.001		0.007	0.004	
R <sup>2</sup>			0.236	0.118		0.962	0.939		0.633	0.433		0.773	0.914		0.273	0.130	
<i>P value</i>																	
Strain			0.023*	0.133-		0.000***	0.000***		0.000***	0.109-		0.000***	0.000***		0.000***	0.001***	
Cage type			0.799-	0.656-		0.000***	0.000***		0.000***	0.001***		0.000***	0.000***		0.004**	0.008**	
Strain x Cage type			0.883-	0.919-		0.000***	0.657-		0.000***	0.000***		0.000***	0.000***		0.000***	0.036*	

\*:P<0.05, \*\*:P<0.01, \*\*\*:P<0.001, -: Non significant

## DISCUSSION

Except for the period up to 24 weeks of age, egg production was influenced by strain. Brown strain hens showed higher egg production compared to white strain hens in the research. These results support other findings that indicate the significant impact of strain on egg production (Cunningham and Ostrander 1982). Vits et al. (2005) reported higher average hen-day egg production in brown hen strains compared to white hen strains. However, Singh et al. (2009), Riczu et al. (2004), Ershad (2005) and Stojčić et al. (2012) reported results contradicting this study, stating that egg production was higher in white egg-laying hens. This result may have been related to the strain x cage type interaction detected in this study. Because the brown strains had higher hen-day and hen-housed egg production for both cage types.

In this study, hen-day egg production was high in enrichable cages, but hen-housed egg production was low in the enrichable cages. This may be related to the mortality rate, as the mortality rate observed in the enrichable cages was higher than the mortality rate in the conventional cages. From 19 to 56 weeks, the average hen-housed egg production of the hens in conventional cages was 2.62% higher than that of hens in the enrichable cages. Similarly, Gerzilov et al. (2012) reported that hens in conventional cages produced more eggs throughout the entire production period. On the other hand, Stojčić et al. (2012) and Gerzilov et al. (2012) found that hens in enriched cages produced fewer eggs.

The interaction between strain and cage type affected the hen-housed egg production, with both white and brown strains showing lower egg production in enrichable cages. This interaction shows that egg production was affected in a correlated manner by both strain and cage type. These results indicate that egg production of both strains was negatively affected by enrichable cage conditions. Similar results for egg

production between 20 and 30 weeks of age were reported by Singh et al. (2009). Enriched cage systems have been recommended as a balanced solution combining egg-laying efficiency and improved animal welfare (Gerzilov et al. 2012; Philippe et al. 2020). However, the lack of equipment such as perches and nests in the enrichable cages used in this study, as well as the fact that the cage area per bird was not superior to conventional cages, may have been reasons for the lower egg production. This suggests that the conditions in the enrichable cages may have been more stressful for the birds and the interaction between strain and environment may have had negative effects (Pavlik et al. 2008). This argument is consistent with Stojčić et al. (2012), who reported that birds kept in enriched cages, especially brown strains, had a shorter time to first egg. In addition, the lack of nests in enrichable cages and the possibility of laying eggs on the floor of these larger colony cages in crowded conditions may also have been a factor in the consumption of eggs by hens (Ledvinka and Klesalová 2012).

In enrichable cages, white strain hens produced fewer eggs (1.45 and 0.81 % hen-day and hen-housed egg production, respectively) compared to brown strains. This means that enrichable cage conditions had a negative effect on white hens. These results are consistent with the report by Stojčić et al. (2012), who found that white hens in conventional cages had the best hen-housed egg production. However, the brown strain hens in enrichable cages had lower hen-housed egg production than the brown hens in conventional cages (4.55%), showing that the brown strain hens were more negatively affected by being housed in enrichable cages. In fact, the mortality rate of brown hens in enrichable cages was higher than that of brown hens in conventional cages (0.17 and 0.27 % more for periods 1 and 2). It may be that the enrichable cage systems were more stressful for the hens as Pavlik et al. (2008) found that hens housed in

enriched cages had similar or higher corticosterone levels than hens housed in standard conditions. They concluded that keeping hens in conventional cage systems was not stressful.

The impact of strain on mortality was only significant up to 32 weeks, after which it became insignificant. This result suggests that mortality rates were not different between the two strains of hens in the later stages of the laying cycle. These findings are consistent with studies by Tactacan et al. (2009) and Freire and Cowling (2013), who reported that mortality rates in commercial laying genotypes were similar regardless of cage design. However, weekly mortality rates were significantly affected by cage type across all laying periods in the study. Enrichable cages had the highest mortality rates, which is consistent with the egg production results and confirms the negative conditions in enrichable cages. Similarly, Gerzilov et al. (2012) reported higher mortality in enriched cages compared to conventional cages. Singh et al. (2009) also reported a significant effect housing system on mortality. In the present study, there was no significant strain x cage type effect on mortality, as the strain x cage type interaction became insignificant after 32 weeks of age. This result suggests that the high mortality in enrichable cages may have been influenced by factors other than genetic makeup or cage design, such as diseases, mineral deficiencies, fatty liver syndrome, prolapses and aggressive pecking (Fulton 2017).

Dirty and broken egg rates were influenced by strain, and Zita et al. (2009) reported a similar strain effect. In this study, white strain hens had higher dirty and broken egg rates. The observed effects of the strain may be a result of the selection that has been carried out for higher egg production and better egg quality. (Wolc et al. 2012). These results are in line with the report of Campo et al. (2007) of higher broken egg rates in white hens but in contrast to Vits et al. (2005), who reported higher broken egg rates in

brown hens. In this study, dirty and broken egg rates were influenced by cage type, in agreement with similar reports made by Wall et al. (2002). Wall et al. (2002) found that cracked eggs were generally more common in enriched cages than conventional cages, which may be related to the confined space in which eggs were laid, leading to easier collisions between eggs and potential damage to eggshells. However, Tactacan et al. (2009) stated that cage type did not affect the overall percentage of broken eggs. Dirty and broken egg rates were higher in enrichable cages. Similarly, compared to conventional cages, Tactacan et al. (2009) reported lower dirty egg rates. This might be due to the larger space in enrichable cages, resulting in more crowded conditions within the cages (Hamilton and Bryden 2021), or the presence of stationary claw abrasives at the front of the cages leading to the accumulating of droppings (Appleby et al. 2002; Tactacan et al. 2009).

The rate of dirty egg was influenced by the strain x cage type interaction from week 25 onwards, while the rate of broken eggs was influenced by this interaction from week 33 onwards. In white hens housed in enrichable cages, both the dirty and broken egg rates were higher (0.104% and 0.056%, respectively). However, broken eggs were more frequent (0.054 %) when brown hens were kept in the enrichable cage and in conventional cages dirty eggs were more frequent in the conventional cage (0.059 %). Vitz et al. (2005) reported that broken eggs were higher in brown hens, while dirty eggs were higher in white hens. The enrichable cages used in this study did not include equipment such as perches and nests, which are recommended for enhancing animal welfare for enriched cage systems and they had a different design from conventional cages in terms of colony size, being larger with 18 to 19 hens per colony compared to conventional cages. Indeed, Wall and Tauson (2007) found that small groups of hens housed in enriched colony cages exhibited similar

production and mortality outcomes as those housed in conventional cages Fulton (2017) noted that increasing group size in poultry could have significant effects on animals, social organizations, and welfare of birds. As a result, the more crowded enrichable cages without enrichment equipment were observed to have lower egg production, higher mortality and higher rates of dirty and broken eggs.

## CONCLUSION

Hen-day and hen-housed egg production were significantly affected by both strain and cage type. Egg production was higher in conventional cages and in brown egg strains. While the strain effect on mortality became insignificant after 32 weeks, the highest mortality rates were observed in enrichable cages. There were significant differences in dirty and broken egg rates among strain and cage types. The rates of dirty and broken eggs were higher in enrichable cages and for white strains. Egg production, broken and dirty egg rates and mortality were influenced by the strain x cage type interactions. In conclusion, enrichable cages had lower egg production, higher mortality, and higher dirty and broken egg rates compared to conventional cages.

**Financial support:** No funding was received for this study.

**Conflict of interest:** The authors declare that there are no actual, potential, or perceived conflicts of interest in this article.

**Ethical Approval:** Ethical approval for this study has been obtained with reference number AKUHADYK-244-17. In addition, the authors declare that research and publication ethics have been adhered to.

**Similarity ratio:** The authors declare that the similarity ratio of the article is the same as that reported in the system, which is 17%.

**Explanation:** This research has been summarised from the Master's thesis of the first author.

## REFERENCES

- Alig, B. N., Malheiros, R. D., & Anderson, K. E. (2023).** Evaluation of physical egg quality parameters of commercial brown laying hens housed in five production systems. *Animals* 13(4), 716. doi:10.3390/ani13040716.
- Anonymous (2014).** Yumurtacı Tavukların Korunması İle İlgili Asgari Standartlara İlişkin Yönetmelik. Resmi Gazete No: 29183, 23 Aralık 2014.
- Appleby, M. C., Walker, A. W., Nicol, C. J., Lindberg, A. C., Freire, R., Hughes, B. O., & Elson H. A. (2002).** Development of furnished cages for laying hens. *British Poultry Science*, 43, 489–500. doi:10.1080/0007166022000004390.
- Brown Nick (2016).** Brown Nick new management guide. H & N International GmbH (<https://www.feedonline.ir/aa18.pdf>).
- Campo, J. L., Gil, M. G., & Davila, A. S. (2007).** Differences among white-, tinted-and brown-egg laying hens for incidence of eggs laid on the floor and for oviposition time. *Archiv Fur Geflugelkunde*, 71(3), 105-109.
- Cunningham, D. L., & Ostrander, C. E. (1982).** The effects of strain and cage shape and density on performance and fearfulness of White Leghorn layers. *Poultry Science*, 61(2), 239-243. doi:10.3382/ps.0610239.
- David, B., Oppermann Moe, R., Michel, V., Lund, V., & Mejdell, C. (2015).** Air quality in alternative housing systems may have an impact on laying hen welfare. Part I—Dust. *Animals*, 5(3), 495-511. doi:10.3390/ani5030368.
- Ershad, S. M. E. (2005).** Performance of hybrid layers and native hens under farmers' management in a selected area of Bangladesh. *International Journal of Poultry Science*, 4(4), 228-232.
- Freire, R., & Cowling, A. (2013).** The welfare of laying hens in conventional cages and alternative systems: first steps towards a quantitative comparison. *Animal Welfare*, 22(1), 57-65. doi:10.7120/09627286.22.1.057.
- Fulton, R. M. (2017).** Causes of normal mortality in commercial egg-laying chickens. *Avian diseases*, 61(3), 289-295. doi:10.1637/11556-120816-RegR.
- Gerzilov, V., Datkova, V., Mihaylova, S., & Bozakova, N. (2012).** Effect of poultry housing systems on egg production. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18(6), 953-957.



- Hamilton, R. M. G., & Bryden, W. L. (2021).** Relationship between egg shell breakage and laying hen housing systems—an overview. *World's Poultry Science Journal*, 77(2), 249-266. doi:10.1080/00439339.2021.1878480.
- Heflin, L. E., Malheiros, R., Anderson, K. E., Johnson, L. K., & Raatz, S. K. (2018).** Mineral content of eggs differs with hen strain, age, and rearing environment. *Poultry Science*, 97(5), 1605-1613. doi:10.3382/ps/pey025.
- Hy-Line W-80 (2016).** Hy-Line W-80 Commercial Layer Management guide, Hy-Line International ([https://hylina.com/wp-content/uploads/2019/10/W-80\\_English-1.pdf](https://hylina.com/wp-content/uploads/2019/10/W-80_English-1.pdf)).
- Ledvinka, Z., Zita, L., & Klesalová, L. (2012).** Egg quality and some factors influencing it: a review. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 43(1), 46-52.
- Ortiz, D., Lawson, T., Jarrett, R., Ring, A., Scoles, K. L., Hoverman, L., Rocheford, E., Karcher, D.M., & Rocheford, T. (2021).** Biofortified orange corn increases xanthophyll density and yolk pigmentation in egg yolks from laying hens. *Poultry Science*, 100(7), 101117. doi:10.1016/j.psj.2021.101117.
- Pavlik, A., Jezova, D., Zapletal, D., Bakos, J., & Jelinek, P. (2008).** Impact of housing technology on blood plasma corticosterone levels in laying hens. *Acta Veterinaria Hungarica*, 56(4), 515-527. doi:10.1556/avet.56.2008.4.9.
- Philippe, F. X., Mahmoudi, Y., Cinq-Mars, D., Lefrançois, M., Moula, N., Palacios, J., Pelletier, F., & Godbout, S. (2020).** Comparison of egg production, quality and composition in three production systems for laying hens. *Livestock Science*, 232, 103917. doi:10.1016/j.livsci.2020.103917.
- Riczu, C. M., Saunders-Blades, J. L., Yngvesson, H., K., Robinson, F. E., & Korver, D. R. (2004).** End-of-cycle bone quality in white-and brown-egg laying hens. *Poultry Science*, 83(3), 375-383. doi:10.1093/ps/83.3.375.
- Sherwin, C. M., Richards, G. J., & Nicol, C. J. (2010).** Comparison of the welfare of layer hens in 4 housing systems in the UK. *British Poultry Science*, 51(4), 488-499. doi:10.1080/00071668.2010.502518.
- Singh, R., Cheng, K. M., & Silversides, F. G. (2009).** Production performance and egg quality of four strains of laying hens kept in conventional cages and floor pens. *Poultry Science*, 88(2), 256-264. doi:10.3382/ps.2008-00237.
- Stojčić, M. D., Perić, L., Milošević, N., Rodić, V., Glamočić, D., Škrbić, Z., & Lukić, M. (2012).** Effect of genotype and housing system on egg production, egg quality and welfare of laying hens. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10, 556-559.
- Super Nick (2017).** Super Nick White egg layers new management H & N International GmbH (<https://feedonline.ir/aa17.pdf>).
- Tactacan, G. B., Guenter, W., Lewis, N. J., Rodriguez-Lecompte, J. C., & House, J. D. (2009).** Performance and welfare of laying hens in conventional and enriched cages. *Poultry science*, 88(4), 698-707. doi:10.3382/ps.2008-00369.
- Vits, A., Weitzenbürger, D., Hamann, H., & Distl, O. (2005).** Production, egg quality, bone strength, claw length, and keel bone deformities of laying hens housed in furnished cages with different group sizes. *Poultry science*, 84(10), 1511-1519. doi:10.1093/ps/84.10.1511.
- Wall, H., R. Tauson, & K. Elwinger. (2002).** Effect of design, passages, and hybrid on use of nest and production of layers in furnished cages. *Poultry Science*, 81, 333-339. doi:10.1093/ps/81.3.333.
- Wolc, A., Arango, J., Settari, P., O'Sullivan, N. P., Olori, V. E., White, I. M. S., Hill, W.G., & Dekkers, J. C. M. (2012).** Genetic parameters of egg defects and egg quality in layer chickens. *Poultry Science*, 91(6), 1292-1298.
- Xin, H., Gates, R. S., Green, A. R., Mitlochner, F. M., Moore Jr, P. A., & Wathes, C. M. (2011).** Environmental impacts and sustainability of egg production systems. *Poultry Science*, 90(1), 263-277.
- Yılmaz Dikmen, B., Ipek, A., Şahan, Ü., Petek, M., & Sözcü, A. (2016).** Egg production and welfare of laying hens kept in different housing systems (conventional, enriched cage, and free range). *Poultry Science*, 95(7), 1564-1572. doi:10.3382/ps/pew082
- Zita, L., Tůmová, E., & Štolc, L. (2009).** Effects of genotype, age and their interaction on egg quality in brown-egg laying hens. *Acta Veterinaria Bruno*, 78(1), 85-91

## The Effects of High Calcium and Vitamin D on the Fructose- Induced Lipogenesis Pathway in Rats

Semiha Özge KARA<sup>1</sup>, Akın YAKAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biochemistry and Genetic, Institute of Health Sciences, Hatay Mustafa Kemal University, Hatay, Türkiye

<sup>2</sup>Department of Genetic, Faculty of Veterinary Medicine, Hatay Mustafa Kemal University, Hatay, Türkiye

### ABSTRACT

In this study, the protective effects of high amounts of dietary calcium and vitamin D on fructose-induced lipogenesis were investigated at molecular and biochemical levels. Control group (Con, n=8), High fructose diet group (F, n=8), High fructose diet+75 mg CaCO<sub>3</sub> and 26.4 IU vitamin D<sub>3</sub> group (FCaD1, n=8), High fructose diet+150 mg CaCO<sub>3</sub> and 52.8 IU vitamin D<sub>3</sub> group (FCaD2, n=8) including experimental groups were fed for 28 days. The significant difference between the living weights was determined firstly as 278.64±5.61<sup>a</sup>; 268.94±2.80<sup>ab</sup>; 257.93±4.86<sup>b</sup> and 257.38±3.42<sup>b</sup> g in the Con, F, FCaD1, FCaD2 groups, respectively, at the end of the first week (P<0.05). This difference was seen to persist during the 3rd week of the trial. It was observed that this difference continued until the end of the 3rd week of the study. In the study, plasma Triglyceride (TG) amount was found to be in the form of 36.25±2.76<sup>b</sup>; 99.13±15.63<sup>a</sup>; 98.50±18.00<sup>a</sup> and 79.88±9.33<sup>ab</sup> mg.dl<sup>-1</sup> in Con, F, FCaD1 and FCaD2 groups, respectively (P<0.05). The SCD-1 gene's liver expression levels were assessed as 11.83±2.08 (P<0.001); 5.31±1.40 (P<0.05) and 5.18±1.43 (P<0.05), respectively, compared to the Con group; *SREBP-1c* was determined as 2.11±0.37 (P<0.05); 3.41±1.20 (P<0.05) and 1.79±0.30 (P<0.05), respectively. In this study, it has been shown through the *SREBP-1c* and *SCD-1* genes that calcium-vitamin D supplementation can have positive effects in a short time against lipogenesis induced by high fructose diet.

**Keywords:** Calcium, Fructose, Lipogenesis, Liver, Vitamin D

\*\*\*

## Ratlarda Yüksek Kalsiyum ve Vitamin D'nin Fruktozla İndüklenmiş Lipogenez Yolağı Üzerine Etkileri

### ÖZ

Bu çalışmada diyetle alınan yüksek miktarlardaki kalsiyum ve vitamin D'nin fruktozla indüklenmiş lipogenez üzerine olabilecek koruyucu etkileri moleküler ve biyokimyasal düzeyde araştırılmıştır. Kontrol grubu (Kon, n=8), Yüksek fruktozlu diyet grubu (F, n=8), Yüksek fruktozlu diyet+75 mg CaCO<sub>3</sub> ve 26,4 IU vitamin D<sub>3</sub> alan grup (FCaD1, n=8), Yüksek fruktozlu diyet+150 mg CaCO<sub>3</sub> ve 52,8 IU vitamin D<sub>3</sub> alan grup (FCaD2, n=8) olmak üzere 4 grup rat 28 gün boyunca beslenmiştir. Canlı ağırlıklar arasındaki anlamlı farklılık ilk olarak 1. hafta sonunda Kon, F, FCaD1, FCaD2 gruplarında sırasıyla 278,64±5,61<sup>a</sup>; 268,94±2,80<sup>ab</sup>; 257,93±4,86<sup>b</sup> ve 257,38±3,42<sup>b</sup> g olarak tespit edilmiştir (P<0,05). Bu farklılığın çalışmanın 3. haftasının sonuna kadar devam ettiği görülmüştür. Çalışmada plazma TG miktarının Kon, F, FCaD1 ve FCaD2 gruplarında sırasıyla 36,25±2,76<sup>b</sup>; 99,13±15,63<sup>a</sup>; 98,50±18,00<sup>a</sup> ve 79,88±9,33<sup>ab</sup> mg.dl<sup>-1</sup> şeklinde olduğu görülmüştür (P<0,05). Karaciğerde *SCD-1* geninin ekspresyon seviyeleri Kon grubuna göre sırasıyla 11,83±2,08 (P<0,001); 5,31±1,40 (P<0,05) ve 5,18±1,43 (P<0,05) olarak, *SREBP-1c* geninin ekspresyon seviyeleri ise sırasıyla 2,11±0,37 (P<0,05); 3,41±1,20 (P<0,05) ve 1,79±0,30 (P<0,05) olarak tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada, yüksek fruktozlu diyet ile indüklenmiş lipogeneze karşı kalsiyum-vitamin D takviyesinin kısa sürede olumlu etkilerinin olabileceği *SREBP-1c* ve *SCD-1* genleri üzerinden gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Fruktoz, Kalsiyum, Karaciğer, Lipogenez, Vitamin D

To cite this article: KARA SÖ. Yakan A. The Effects of High Calcium and Vitamin D on the Fructose- Induced Lipogenesis Pathway in Rats. (2023) 16(4):541-555

Submission: 23.06.2023 Accepted: 08.12.2023 Published Online: 12.12.2023

ORCID ID; SÖK: 0000-0003-2272-0968 AY: 0000-0002-9248-828X

\*Corresponding author e-mail: [yakanakin@hotmail.com](mailto:yakanakin@hotmail.com)

changes in the body can be studied at molecular and biochemical levels (Chiu et al. 2018; Özkan and

## INTRODUCTION

There are many homeostasis systems in the body. Energy metabolism is one of these systems. The liver is a metabolic organ that controls the body's energy metabolism and plays a central role in metabolically binding to various tissues, including skeletal muscle and fat tissue, and energy metabolism is strictly controlled in this organ. Due to imbalances in diet and exercise conditions, disturbances in energy metabolism can occur and homeostasis can be disrupted. Disorders in energy metabolism can lead to chronic diseases associated with obesity and even cause the development of these diseases (Rui 2014). Today, approximately 2 billion adults are reported to be overweight, and about 650 million of these people are expected to be obese (Marziou et al. 2020). Due to the rising prevalence of obesity, the metabolic disease known as the metabolic syndrome may manifest (Eckel et al. 2005). Obesity can lead to non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), one of the characteristics of the metabolic syndrome (Marziou et al. 2020).

The signs of NAFLD include by more than 5% accumulation of triglycerides (TG) in hepatocytes. This is a result of the increased intake of fatty acids by the liver. TGs can also be formed as a result of de novo lipogenesis (DNL) (Agame-Lagunes et al. 2021). DNL is one of the metabolic pathways that synthesize fatty acids from excess carbohydrates (Gathercole et al. 2013). Approximately 26% of liver lipids in patients with NAFLD have been found to be caused by DNL (Agame-Lagunes et al. 2021). In researching metabolic disorders such as NAFLD and developing treatment strategies, experimental animals are often used as model organisms (Kleinert et al. 2018). The use of simple carbohydrates such as fructose in animal models can induce DNL, and

Yakan, 2019). However, the consumption of fructose can be a risk factor for the development of NAFLD and may trigger fatty liver for an average of 1 week when added to drinks that are consumed extensively (Agame-Lagunes et al. 2021).

Despite various dietary strategies, it is difficult for obese people to lose weight and then maintain their weight. Obese people struggle to lose weight and then keep it off despite trying a variety of dietary approaches. When the distribution and composition of dietary macronutrients (carbohydrates, fats, and proteins) are altered, variable amounts of weight loss and improvements in metabolic syndrome characteristics can be achieved (Abete et al. 2010). On the one hand, while attention is paid to the effects of dietary macronutrient surplus rates on body weight, studies have shown that calcium in the diet can play a role in regulating body fat and body weight (Melanson et al. 2003). In addition to calcium, vitamin D, one of the fat-soluble vitamins, is also a micronutrient extract with significant effects on human health (Ning et al. 2015). In addition to its well-known effects on calcium metabolism and skeletal formation, vitamin D has been shown to be active in the expression levels of more than 200 genes in various metabolic pathways (Yin et al. 2012). Epidemiological studies have also shown that vitamin D deficiency is associated with obesity (Mansouri et al. 2019).

Calcium is the 5<sup>th</sup> most abundant element found in the skeleton in more than 99% of the body of the vertebrate (Li et al. 2020). Calcium plays an important role in many physiological processes. It is also known that calcium plays a role in lipid and glycogen metabolism and may be responsible for balancing body weight (Li et al. 2018). Calcium may

have an anti-obesity effect through the regulation of adipogenesis. This adipogenesis is regulated by the stimulation of mesenchymal stem cells and the inhibition of preadipocytes in the differentiation phase. Calcium can also have an effect by reducing lipogenesis and increasing lipolysis. It can also have an anti-obesity effect in such ways as promoting the proliferation of preadipocytes and apoptosis, increased activation of brown fat tissue and increased thermogenesis by browning of white fatty tissue, suppression of fat absorption and promotion of fecal fat discharge, and modification of the composition and diversity of the intestinal microbiome (Zhang et al. 2019).

Studies examining the effects of both calcium and vitamin D on body weight and/or abdominal fat have been insufficient (Zarghani et al. 2016). In general, however, the recommended anti-obesity mechanisms of calcium and vitamin D include regulation of adipocyte death, adipogenesis, and lipid metabolism (Song and Sergeev 2012).

The active form of vitamin D increases the absorption of calcium in the duodenum (Thacher and Clarke 2011). Considering this effect of vitamin D on calcium absorption, rats were given calcium and vitamin D supplements together in this study. Although the relationship between vitamin D and body weight gain is still a matter of debate, a lack of vitamin D is linked to both overall and abdominal obesity according to a report by Mansouri et al. (2019). Maia-Ceciliano et al. (2019) in a study feeding adult male mice of the C57BL/6 breed with or without a control diet containing vitamin D (10,000 IU.kg<sup>-1</sup> vitamin D<sub>3</sub>) or a high-fructose diet (474.3 g.kg<sup>-1</sup> fructose), there was no significant difference in body weight between the groups. In another study, rats found that vitamin D<sub>3</sub> supplementation or exposure to sunlight during pregnancy helped to control weight and thus prevent pregnancy complications associated with obesity (Kang et al.

2015). There are many studies on the anti-obesity and anti-lipogenic effects of calcium or vitamin D supplements alone. This study examined the protective effects of high amounts of calcium and vitamin D in the diet on fructose-induced lipogenesis. From the transcription factors that play an important role in the formation of hepatic lipogenesis in this scope, the expression levels of *SREBP-1c*, *ACACA*, *FASN* and *SCD-1* genes have been determined.

## MATERIALS and METHODS

### Experimental groups and applications

The study used male rats of Wistar albino race aged 8–10 weeks, weighing about 200–250 g and the rats were subjected to environmental conditions for a week before the experimental protocol began. At the beginning of the study, four groups were formed so that there was no statistically significant difference in the body weight of the rats ( $P>0.05$ ). The groups were formed as the control group (Con), the high fructose diet group (F), the high fructose diet+75 mg CaCO<sub>3</sub> and the 26.4 IU vitamin D<sub>3</sub> group (FCaD1), the high fructose diet+150mg CaCO<sub>3</sub>, and the 52.8 IU Vitamin D<sub>3</sub> Group (FCaD2). The animals were housed in transparent polycarbonate cages with 4 rats in each cage. Rats were also given food and water as ad libitum, and their daily consumption was recorded. During operation, the light in the environment is set to be 12 hours light, 12 hours dark (07:00–19:00 light, 19:00–07:00 dark), moisture ratio 55%, and ambient temperature  $21\pm 2$  °C. However, the rats were checked at least twice a day during the working period.

Rats in the formed groups were given different diets for 4 weeks. Rats in the groups F, FCaD1 and FcaD2 were given 2600 kcal.kg<sup>-1</sup> of metabolically energized pellets. Rats in group F were given ad libitum water/fructose solution with 1 kcal of metabolic energy per ml in addition to pellets. Rats

in the FCaD1 and FCaD2 groups were given different doses of calcium and vitamin D through oral gavage in addition to the diet in the F group. Oral gavage was administered to rats in the FCaD1 and FCaD2 groups daily at 8:00 a.m. until the end of the feeding period. Fructose solutions were prepared daily and offered for fresh consumption.

The daily amounts of energy that rats in the experimental groups would receive were planned similarly to the requirements (National Research Council, 1995) (Table 1).

Weekly changes in body weight and amounts of water/fructose solution consumed with feed were recorded during the feeding period. At the end of the feeding period, the rats were left hungry for 12 hours but were able to reach the water ad libitum. Rats were anesthetized (80 mg.kg<sup>-1</sup> ketamine and 12 mg.kg<sup>-1</sup> xylazine, IP) and euthanized by taking blood from the heart. In order to inhibit the nuclease activity and maintain the RNA quality by washing it with nuclease-free water, the rat liver tissue was rapidly removed and frozen in liquid nitrogen. After being frozen, the tissues were kept at -86 °C for molecular analysis.

### Laboratory Analyses

Blood samples taken during euthanasia were centrifugated at +4 °C at 3000xg for 10 minutes and plasma was obtained. These plasmas were preserved at -86 °C until biochemical parameters were determined. Plasma High Density Lipoprotein (HDL), Low Density Lipoprotein (LDL), total cholesterol, triglycerides, and hunger blood glucose parameters were determined using an autoanalyzer (SIEMENS Advia 1800, Japan).

Total RNA isolation was done according to the TRIzol method (Rio et al. 2010) and the purity and concentration of the resulting RNAs were measured in nucleic acid meter (Merinton, SMA-1000). RNA quality was assessed with 100 V in

electrophoresis and 1% agarose gel in 25 minutes and later, RNA integrity was checked rRNA subunits. Examples suitable for purity (A260/280: 1.8–2.2), concentration (>125 ng.µl<sup>-1</sup>) and agarose gel electrophoresis were used. To prevent possible DNA contamination in these examples, DNA digestion was carried out using the DNase kit (DNase I, RNase free, Thermo Scientific, Catalog No: EN0521, USA) protocol, then RNA samples were converted to cDNA with the Revertaid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Science, Catalyst No: K1622, USA). The final volume of the post-reaction samples was completed at 200 µl with non-nuclease water and stored at -20 °C until analysis.

Amplification of *SREBP-1c*, *ACACA*, *FASN*, and *SCD-1* genes from cDNA samples was performed using real-time PCR (Rotor-Gene Q, Qiagen, USA). For amplification, the SYBR Green kit (Power SYBR Green PCR Master Mix, ThermoFisher Scientific, Catalog No: 4367659, USA) was used. The forward and reverse primary sequences of the genes to be amplified are given in Table 2. Real-time PCR is regulated to 15 seconds at 95 °C, 60 seconds at 60 °C and 40 cycles after 10 minutes of denaturation. Peptidyl prolyl isomerase A (*PPLA*) is used as a housekeeping gene. The Ct values of the genes are normalized according to the housekeeping gene and are calculated as layer changes. The RT-qPCR application is done as a duplicate. Post-reaction RT-qPCR products were controlled to be amplified by the correct gene by running at 100 V for 45 min in 1.5% agarose gel electrophoresis.

### Statistical analysis

Variance analysis in repeated measurements was used to evaluate the weekly changes in the body weight of the rats. In cases where differences were detected, Bonferroni correctional simple effect analysis was used as a post-hoc test. The differences in biochemical parameters between groups were

assessed by Variance analysis. The Tukey test was used as a post-hoc test for variables with differences. All statistical calculations are performed using the IBM SPSS version 23.0 program. For the statistical

calculation of gene expression results, the  $2^{-\Delta\Delta^{ct}}$  method was used and the results were given as fold change (Livak and Schmitgen 2001). In all analyses,  $P < 0.05$  was accepted as meaningful.

**Table 1.** Rations and applications in experimental groups  
**Tablo 1.** Deneme gruplarında rasyon ve uygulamalar

Contents	Experiment groups			
	Con	F	FCaD1	FCaD2
Feed	2600 kcal.kg <sup>-1</sup>	2600 kcal.kg <sup>-1</sup>	2600 kcal.kg <sup>-1</sup>	2600 kcal.kg <sup>-1</sup>
Water	0 kcal.ml <sup>-1</sup>	1 kcal.ml <sup>-1</sup>	1 kcal.ml <sup>-1</sup>	1 kcal.ml <sup>-1</sup>
Calcium	-	-	75 mg CaCO <sub>3</sub> (30 mg Ca)	150 mg CaCO <sub>3</sub> (60 mg Ca)
Vitamin D <sub>3</sub>	-	-	26,4 IU	52,8 IU

**Table 2.** Forward and reverse primer series of amplified genes  
**Tablo 2.** Genlere ait forward ve reverse primer dizileri

Genes	Accession no*	Forward and Reverse Primer Sequence	Bp* *	Reference
<i>PPIA</i> ***	NM_017101.1	F:5'-CAGACAAAGTTCCAAAGACAGCA-3' R: 5'-CACCTGGCACATGAATCCT-3'	117	Santos et al. 2016
<i>ACACA</i>	NM_022193.1	F: 5'-CAATCCTCGGCACATGGAGA-3' R:5'-GCTCAGCCAAGCGGATGTAGA-3'	149	Gou et al. 2016
<i>FASN</i>	NM_017332.1	F: 5'-GCTGCTACAAACAGGACCATC-3' R: 5'-TCCACTGACTCTTCACAGACCA-3'	98	Mock et al. 2017
<i>SCD-1</i>	NM_139192.2	F: 5'-CCTTAACCTGAGATCCCCTAGA-3' R: 5'-AGCCCATAAAAGATTTCTGCAAA-3'	95	Yasari et al. 2010
<i>SREBP-1c</i>	NM_001276707.1	F: 5'-GCAACACTGGCAGAGATCTACGT-3' R: 5'-TGGCGGGCACTACTTAGGAA-3'	104	He et al. 2004

\*: NCBI GenBank accession number, \*\*: Base pair, \*\*\*: Housekeeping gene

## RESULTS

### Energy Consumption and Living Weight Change

The feed, water and energy consumption of the animals in the groups was measured over 4 weeks, with live weights and daily. Significant differences in living weight between the groups were first observed at the end of week 1 ( $P < 0.05$ ), whereas the group's live weight averages were initially approximately 220 g ( $P > 0.05$ ). This difference was shown to persist at different levels of significance until the end of the third week of the study. At the end of the first week, fewer body weight gains were observed in the FCaD1

and FCaD2 groups compared to the Con group ( $P < 0.05$ ). At the end of week 2 of the study, a lower body weight gain was observed in both the FCaD1 and FcaD2 groups compared to both the Con and F groups ( $P < 0.001$ ). By the end of week 3 of the study, a lower body weight gain was observed in the FCaD1 and FCaD2 groups compared to the Con group ( $P < 0.01$ ). At week 4 of the study, there was no significant difference in living weight between the groups (Table 3).



## Biochemical parameters

Values for certain biochemical parameters in plasma are shown in Table 4. There were no statistically significant results for plasma glucose, total cholesterol, HDL and LDL among the groups. The biochemical parameters studied in the study showed that the plasma TG levels were  $36.25 \pm 2.76^b$ ;  $99.13 \pm 15.63^a$ ;  $98.50 \pm 18.00^a$ ;  $79.88 \pm 9.33^{ab}$  in the Con, F, FCaD1 and FCaD2 groups, respectively, and that the increases in plasma TG levels in the Con group were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Plasma TG levels in the FCaD2 group are similar to those in the Con groups (Table 4).

## Gene Expression

RNA isolation samples with sufficient purity ( $A_{260}/A_{280}: 1.87 \pm 0.01$ ) and concentration ( $675.30 \pm 31.12 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) were used after integrity and

quality checks in agarose gel electrophoresis. Results from the expression levels of *ACACA*, *FASN*, *SCD-1*, *SREBP-1c* genes are shown in Table 5. According to the control group, *ACACA* gene expression was approximately twice as expressed in the F group, about seven times in the FCaD1 group, and about two and a half times ( $P < 0.05$ ). *FASN* gene expression increased approximately twice in all trial groups. However, a statistically significant increase was observed only in the FCaD2 group ( $P < 0.05$ ). *SCD-1* gene expression was expressed approximately 12 times in group F ( $P < 0.001$ ) and in groups FCaD1 and FCA2 ( $P < 0.05$ ) about 5 times. The levels of gene expression of *SREBP-1c* were expressed approximately twice in group F; approx. 3.5 times in group FCaD1; and more than 1.5 times ( $P < 0.05$ ) in group FCaD2 (Figure 1).

**Table 3.** Living weight in groups, total energy intake, feed and water intake during the feeding period ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ )

**Tablo 3.** Gruplarda besleme süresince canlı ağırlık, toplam enerji alımı, yem ve su tüketimi ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ )

Feeding period	Traits	Con	F	FCaD1	FCaD2	P
Beginning	Live weight (g)	212.93±4.06	217.78±2.62	218.79±2.56	222.11±4.36	0.334
	Live weight (g)	278.64±5.61 <sup>a</sup>	268.94±2.80 <sup>ab</sup>	257.93±4.86 <sup>b</sup>	257.38±3.42 <sup>b</sup>	<0.05
First week	Total consumed energy (kcal/rat/week)	563.65	632.65	586.24	558.64	
	Energy taken from food (kcal/rat/week)	563.65	371.77	331.68	319.64	
	Energy taken from water (kcal/rat/week)	-	260.88	254.56	239.00	
	Weekly consumed feed (g/rat)	216.79	142.99	127.57	122.94	
	Weekly consumed water (ml/rat)	398.50	260.88	254.56	239.00	
Second week	Live weight (g)	319.78±5.25 <sup>a</sup>	311.90±4.36 <sup>a</sup>	292.06±5.16 <sup>b</sup>	275.19±4.01 <sup>b</sup>	<0.001
	Total consumed energy (kcal/rat/week)	637.26	646.28	587.25	552.11	
	Energy taken from food (kcal/rat/week)	637.26	356.15	333.81	308.00	
	Energy taken from water (kcal/rat/week)	-	290.13	253.44	244.11	
	Weekly consumed feed (g/rat)	245.10	136.98	128.39	118.46	
Weekly consumed water (ml/rat)	431.13	290.13	253.44	244.11		
Third week	Live weight (g)	352.79±6.27 <sup>a</sup>	344.35±4.29 <sup>ab</sup>	323.15±7.57 <sup>b</sup>	322.93±7.53 <sup>b</sup>	<0.01
	Total consumed energy (kcal/rat/week)	657.80	687.02	590.03	629.21	
	Energy taken from food (kcal/rat/week)	657.80	399.39	314.70	319.88	
	Energy taken from water (kcal/rat/week)	-	287.63	275.33	309.33	
	Weekly consumed feed (g/rat)	253.00	153.61	121.04	123.03	
Weekly consumed water (ml/rat)	432.50	287.63	275.33	309.33		
Fourth week	Live weight (g)	368.89±7.56	376.43±6.44	345.93±10.84	356.93±8.13	0.076
	Total consumed energy (kcal/rat/week)	727.35	616.91	656.34	705.42	
	Energy taken from food (kcal/rat/week)	727.35	319.41	336.15	355.03	
	Energy taken from water (kcal/rat/week)	-	297.50	320.19	350.39	
	Weekly consumed feed (g/rat)	279.75	122.85	129.29	136.55	
Weekly consumed water (ml/rat)	496.27	297.50	320.19	350.39		

<sup>a, b</sup>: Different letters in the same rows indicate the difference between groups.

**Table 4.** Biochemical parameters  
**Tablo 4.** Biyokimyasal parametreler

Biochemical parameters	Groups				P
	Con	F	FCaD1	FCaD2	
Glycose (mg/dL)	160.63±9.59	141.88±11.00	136.13±11.47	145.38±11.94	0.453
T. Col (mg/dL)	47.88±2.60	46.25±1.76	50.00±3.07	49.38±1.79	0.687
HDL (mg/dL)	34.69±2.57	32.22±1.22	33.80±1.48	33.29±1.31	0.787
LDL (mg/dL)	9.53±0.81	7.58±0.56	8.96±1.37	9.69±0.78	0.381
TG (mg/dL)	36.25±2.76 <sup>b</sup>	99.13±15.63 <sup>a</sup>	98.50±18.00 <sup>a</sup>	79.88±9.33 <sup>ab</sup>	<0.05

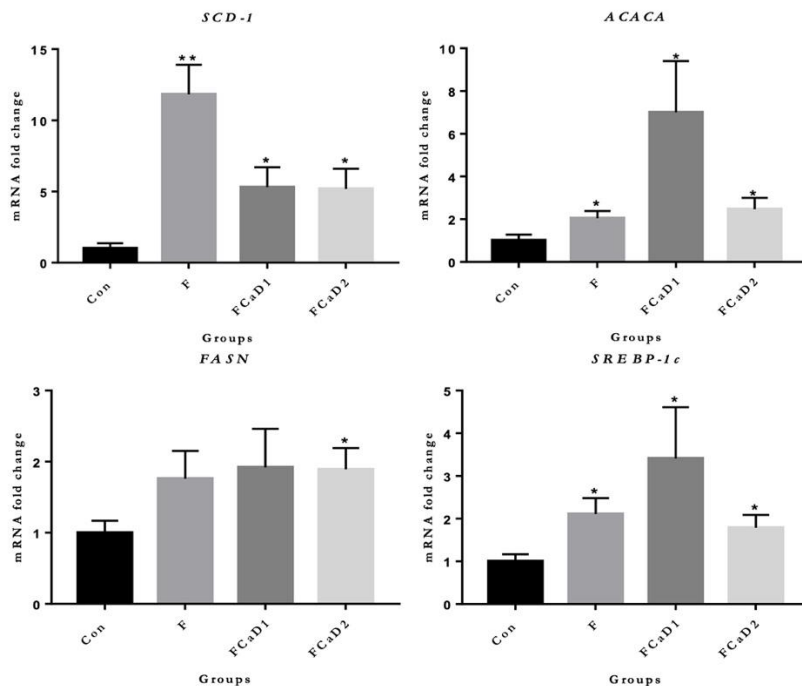
T. Col: Total Cholesterol

<sup>a, b</sup>: Different letters in the same rows indicate the difference between groups.

**Table 5.** Fold changes in liver tissue of ACACA, FASN, SCD-1, SREBP-1c genes according to control group ( $\bar{X} \pm Sx$ )  
**Tablo 5.** Karaciğer dokusunda kontrol grubuna göre ACACA, FASN, SCD-1, SREBP-1c genlerinin kat değişimi ( $\bar{X} \pm Sx$ )

*Genes	F		FCaD1		FCaD2	
	Fold change	P	Fold change	P	Fold change	P
<i>ACACA</i>	2.05±0.34	<0.05	7.00±2.40	<0.05	2.47±0.53	<0.05
<i>FASN</i>	1.76±0.39	0.094	1.92±0.54	0.091	1.89±0.30	<0.05
<i>SCD-1</i>	11.83±2.08	<0.001	5.31±1.40	<0.05	5.18±1.43	<0.05
<i>SREBP-1c</i>	2.11±0.37	<0.05	3.41±1.20	<0.05	1.79±0.30	<0.05

\* Gene expression levels are given as fold change according to control group.



**Figure 1.** Levels of *ACACA*, *FASN*, *SCD-1*, *SREBP-1c* gene expression in liver tissue

**Figür 1.** Karaciğer dokusunda *ACACA*, *FASN*, *SCD-1*, *SREBP-1c* genlerinin ekspresyon seviyeleri

## DISCUSSION

It is that high fructose corn syrup (HFCS) can lead to excessive energy consumption, weight gain and an increased prevalence of obesity (Melanson et al. 2008). This finding can be attributed to the rapid absorption of fructose by the liver and its entry into the glycolysis pathway after skipping the phosphofructokinase regulatory step (Kawasaki et al. 2009). Bocarsly et al. (2010) in a study in which male Sprague-Dawley rats were offered diets containing 8% HFCS or 10% sucrose for 8 weeks, even though they consumed the same total calories, rats fed a diet containing HFCS gained significantly more body weight compared to rats fed the sugar diet. These results suggest that excessive consumption of HFCS may contribute to the incidence of obesity. During this study, however, it was not observed that there was any difference in living weight between the Con and F groups. Depending on the duration of the rat's exposure to fructose (4 weeks), there is no significant change in body weight in rats in group F. According to calcium and vitamin D dosages, there were no appreciable variations in body weight changes between the FCaD1 and FCaD2 groups of rats in the current investigation. According to Zarghani et al. (2016), there were no discernible differences in body weight and Body Mass Index (BMI) parameters between the groups in a study in which male rats with a starting weight of 216 g, fed a high-fat and high-fructose diet for 60 days, were given 4 different doses of calcium and vitamin D3 to supplement their diets (suboptimal, normal, high, and very high calcium and vitamin D3). When it comes to the lack of discernible changes in the body weight of rats that are dose-dependent (FCaD1 and FCaD2), Zarghani et al.'s

(2016) study and the current study are moving in the same way. The rats in the FCaD1 and FCaD2 groups gained less live body weight than the Con group

during the study's first week (P0.05), and this difference persisted at various levels of significance (P0.001 and P0.01) during weeks 2 and 3. Nevertheless, calcium and vitamin D supplementation had no significant dose-dependent effects on the rats' body weight. Accordingly, the current study discovered that groups taking calcium and vitamin D supplements without regard to dose saw lower increases in live body weight than the Con group.

During the study period, the highest energy intake was found in group F in weeks 1, 2, and 3. The feeling of saturation occurs as a result of the insulin hormone triggering the release of leptin. Fructose does not trigger the release of insulin and therefore does not produce a feeling of satiety. In the F-group fed fructose, it is believed that a feeling of satiety may arise due to feed consumption (Özkan 2018). Therefore, in the light of literature scans and the findings of this study, it is believed that the decrease in insulin and leptin levels in the circulation after fructose intake may result in less appetite suppression and consequently increased energy intake (Bantle 2009; Özkan 2018). The lowest energy intake in the current study was observed in the FCaD2 group at weeks 1 and 2 of the feeding period and in the FCaD1 group on week 3. Calcium has been shown to reduce the absorption of fatty acids by creating intestinal calcium and fatty acid soaps and increase the excretion of fecal fat, as well as decrease the

energy taken due to these mechanisms that increase the feeling of satiety (Teegarden 2005; Abete et al. 2010). Papakonstantinou et al. (2003) in a study in male Wistar albino rats who were given a high calcium diet (2.4% calcium) for 85 days that there was no significant difference from the control group in terms of energy consumption at the end of the feeding period.

For 10 weeks, in the study in female Sprague-Dawley rats fed normal or high energy density diets with different rates of calcium (0.2% or 0.6% calcium or 1.8% calcium), rats fed high-energy diets (4.6 kcal.g<sup>-1</sup>) consumed significantly more energy than rats fed a normal energy diet (3.8 kcal.g<sup>-1</sup>). However, the researchers found that there were no significant differences in energy consumption between groups on diets that contained different amounts of calcium (Zhang and Tordoff 2004). Siddiqui et al. (2008) in a study in male Wistar albino rats, who were given a high-fat or high-sugar diet containing calcium-vitamin D (low-calcium (0.25%) and vitamin D (400 IU.kg<sup>-1</sup>) or high calcium (1.5% and vitamin D (10 000 IU.kg<sup>-1</sup> diet) in different doses for 13 weeks, that the high-fat diet group consumed more calories at the end of the feeding period than the high glucose diet group, but there were no significant differences in energy intake between the groups on a calcium vitamin D diet in various doses. The results of studies on the effect of dietary calcium-vitamin D content on energy intake may vary. In this study, Wistar albino rats were given high-dose calcium and vitamin D supplements in addition to a high-fructose diet for 28 days. When examining the amount of energy consumed by the rats, it was found that the rats who took calcium and vitamin D supplements for the first 3 weeks consumed less energy than the control group. The scans of the literature and the results of this study are thought to vary depending on the type of animal, the duration of feeding the animal, and the differences in the calcium-vitamin D doses supplemented with the

diet (Papakonstantinou et al. 2003; Zhang and Tordoff 2004; Siddiqui et al. 2008).

High fructose intake has been shown to have adverse effects on insulin sensitivity/glucose homeostasis (Tappy and Le 2010). As a result of chronic exposure to fructose, glucose regulation is impaired and plasma glucose concentrations increase (Özkan 2018). In this study, rats on high-fructose diets found no significant difference in plasma glucose concentrations. Depending on the duration of the rat's exposure to fructose (4 weeks), it is believed that glucose regulation in rats on a high-fructose diet may not be sufficiently impaired. A study found that the levels of plasma glucose increased significantly when rats were given fructose with their diet for a long period (3 months), which was explained by the metabolic syndrome resulting from chronic consumption of fructose (Özkan 2018). Sergeev and Song (2014) that in a study in which four-week-old male C57BL/6J mice were given a 10-week control diet (10% fatty), a high-fat diet (60% fat), a high-calcium diet, a high-vitamin D diet, or high-calcium+vitamin D diet with a high-fat diet, fasting plasma glucose concentration was significantly lower in mice fed a high-calcium and high-vitamin D diet than in the high-fat diet group. In addition, these researchers found that the concentration of fasting plasma glucose in mice fed a high calcium+vitamin D diet was at the level of the control group concentration. In the current study, rats who consumed different doses of calcium+vitamin D in addition to a high fructose diet found no significant changes in plasma glucose concentrations. This finding is believed to be related to the time rats take calcium+vitamin D supplements (4 weeks). It also confirms that the metabolism of the energy taken from fat and carbohydrates works through different mechanisms of glucose regulation.

In a study conducted in male Wistar Albino rats on a high-fat-fructose diet for 15 weeks, plasma

levels of TG, total cholesterol and LDL increased significantly compared to the control group, while HDL decreased markedly (Aragno et al. 2009). In this study, it is similar to the findings of Aragno et al. (2009) that the TG levels of rats in groups F and FCaD1 increased significantly compared to rats in the Con group. This increase can be attributed to rats in groups F and FCaD1 on high fructose diets (Aragno et al. 2009, Özkan 2018). Some studies in rats have shown that fructose is hyperlipidemic (Tappy and Le 2010; Özkan 2018). However, in the current study, no significant changes were observed in total cholesterol, LDL and HDL levels. As with plasma glucose concentrations, the findings of these biochemical parameters are thought to be affected by the duration of rats' exposure to fructose. In a study in which male rats fed a high-fat and high-fructose diet for 60 days were supplemented with 4 different doses of calcium + vitamin D<sub>3</sub>, they did not observe any significant difference in serum TG, cholesterol and non-HDL cholesterol levels between the groups. However, in rats receiving high and very high doses of calcium-vitamin D<sub>3</sub> supplementation, a significant increase in serum HDL cholesterol was observed compared to the group receiving a normal dose of calcium-vitamin D<sub>3</sub> (Zarghani et al. 2016). In this study, there were no significant differences in the levels of TG, cholesterol and LDL cholesterol in the rats in the FCaD1 and FCaD2 groups compared to rats in group F who were on a high fructose diet. Similar to the study carried out by Zarghani et al. (2016) this study found that calcium-vitamin D supplementation in fructose diet had no effect on plasma TG, cholesterol and LDL levels. In the current study, there was also no significant difference in plasma HDL levels between the groups.

Fructose supplementation to diet is a method often used in animal models to experimentally induce DNL (Chiu et al. 2018; Özkan and Yakan 2019). *SREBP-1c*, which regulates hepatic lipid homeostasis,

has been shown to be a transcription regulator that stimulates the expression of certain genes in DNL such as *ACC* and *FASN* (Yin et al 2012). Dietary calcium, a nutrient that does not provide energy, has been shown to play an important role in regulating energy and lipid metabolism (Jacquemain et al. 2003). Also, higher vitamin D intake has been associated with lower body fat and metabolic health (Zhu et al. 2013). In this study, expression levels were also studied to study the effects of calcium and vitamin D on fructose-induced metabolism due to the possible lipogenic effects of *ACACA*, *FASN*, *SCD-1* and *SREBP-1c* genes.

High fructose intake has been shown to increase hepatic expression of the *ACACA* gene compared to high glucose intakes (Shimada et al. 2019). In this study, *ACACA* gene expression levels were significantly increased in rats in groups F, FCaD1 and FCaD2, who were fed high fructose and calcium and vitamin D in different doses during the 4-week feeding period, compared with the Con group. Studies in rats on high fructose diets have shown increased levels of *ACACA* gene expression (Softhic et al. 2016; Distefano 2020).

In a study of rats fed a high-fat diet, a stronger increase in the expression levels of the *FASN* gene was observed as a result of the addition of fructose to the drinking water of rats compared to a high fat diet (Softhic et al. 2016). Similarly, a study in female Sprague-Dawley rats found that rats on high-fructose diets significantly increased hepatic expression of the *FASN* gene compared to rats fed a high corn starch diet (DiStefano 2020). In this study, a significant increase in the level of expression of the *FASN* gene was observed only in the FCaD2 group.

Depending on the fructose diet, up-regulation of *ACACA*, *FASN* and *SREBP-1c* has been observed in many studies despite the use of different experimental designs, animal models and treatment protocols (Softhic et al. 2016; Maia-

Ceciliano et al. 2019, DiStefano 2020). Despite these findings, the molecular mechanisms affecting the gene expression of fructose are not clearly known. It has been shown that fructose can regulate a number of genes involved in de novo lipogenesis through transcriptomic and epigenetic mechanisms. Fructose intake has also been shown to alter the levels of specific microRNAs (miRNAs) that target molecules involved in lipid metabolism and other biological processes related to hepatic function (DiStefano 2020). It has been suggested that more work is needed to illuminate the mechanisms by which miRNAs play a role in the etiology of NAFLD caused by fructose (Pan et al. 2021). It is believed that the expression levels of the *ACACA* and *FASN* genes in the FCaD1 and FCaD2 groups may have increased more than the F group in comparison with the Con group because of the inadequate activity of the factors suppressing *SREBP-1c*, *ACACA*, and *FASN* such as miR-33, and the insufficient suppression of the levels of expression of factors such as miR-122, miR-370. It is believed that may have triggered lipogenesis of fructose by affecting the mechanisms that control, *SREBP-1c*, *ACACA* and *FASN* genes in F, FCaD1, FCaD2 groups. Thus, it is believed that changes in the levels of expression of *ACACA* and *FASN* genes in the FCaD1 and FCaD2 groups may be influenced by epigenetic mechanisms.

In the current study, the level of *SCD-1* gene expression in the liver of rats in group F increased significantly. In addition, the increased level of *ACACA* gene expression in the liver of rats in group F suggests that the path through Adenosine Monophosphate- Activated Protein Kinase (AMPK) described in the literature may affect hepatic lipogenesis. Das and Choudhuri (2020), in their study on male Wistar albino rats, found that the lipogenic pathway was suppressed by reactivation of AMPK as a result of calcium supplementation given to rats on a high-fat diet. Another study found that the expression

levels of the *SCD-1* gene were suppressed by vitamin D in both the liver and fat tissue of pregnant rats. Depending on these findings, researchers report that a decrease in body weight and fat accumulation following treatment with vitamin D may be linked to the modulation of genes associated with lipogenesis (Kang et al. 2015). In this study, the FCaD1 and FCaD2 groups that received calcium and vitamin D supplementation also observed fewer increases in the levels of *SCD-1* gene expression in the liver than in the F group compared to the Con group. It is believed that calcium and vitamin D supplementation may have suppressed the level of *SCD-1* gene expression, in line with some reports (Kang et al. 2015; Das and Choudhuri 2020). The level of *SCD-1* gene expression in the FCaD2 group was observed to be less elevated compared to the Con group than in the FCaD1 group. Therefore, the current study found that the level of *SCD-1* gene expression was influenced by the dose of calcium and vitamin D.

It has been shown that the effect of dietary carbohydrates such as glucose, fructose and sucrose on significantly increasing hepatic *SCD-1* is dependent on *SREBP-1c* as well as due to independent mechanisms. (Flowers and Ntambi 2008). The activation of *SREBP-1c* plays an important role in the progression of NAFLD caused by a high-fat and fructose diet (Aragno et al. 2009). Fructose has been shown to induce *SREBP-1c* and other lipogenic genes more potently than glucose. Increasing levels of expression of the *SREBP-1c* gene in the liver of rats on a high-fructose diet containing 67% carbohydrates (98% fructose) for 8 weeks have been reported (DiStefano 2020). In this study, the levels of *SREBP-1c* gene expression in rats from trial groups F, FCaD1 and FCaD2 increased significantly compared to the Con group. Inadequate calcium intake during maternal pregnancy and lactation has been shown to increase the expression of *SREBP-1c* in the liver or fat tissue of mouse offspring (Li et al.



2018; Zhang et al. 2019). In one study, vitamin D supplementation in mice on a high fructose diet caused a decrease in the levels of expression of lipogenic genes such as *SREBP-1c* in the liver (Maia-Ceciliano et al. 2019). Vitamin D deficiency in rats has been shown to increase hepatic lipogenesis with fructose intake, while vitamin D supplementation can weaken hepatic steatosis by regulating lipid metabolism through negative regulation of *SREBP-1c* and target genes (Maia-Ceciliano et al. 2019). Yin et al. (2012) showed that vitamin D<sub>3</sub> regulates lipid metabolism by reducing hepatic steatosis in the liver of male adult rats. The protective effect of vitamin D<sub>3</sub> against hepatic steatosis has been achieved by reducing the expression levels of *SREBP-1c* and the target genes *ACC* and *FASN*. Although researchers generally reported that both vitamin D deficiency and fructose intake increased the expression of lipogenesis-related genes in the liver, they reported that the expression levels of these genes were mainly affected by fructose intake (Maia-Ceciliano et al. 2019). In this study, *SREBP-1c* gene expression levels increased less in the FCaD2 group than in the Con group. As with the *SCD-1* gene expression level, the *SREBP-1c* gene expression level was also affected by calcium and vitamin D doses. However, increases in the level of *SREBP-1c* expression in the liver in rats in the FCaD1 group were observed to be greater than in rats in the F group. This outcome observed in the FCaD1 group is thought to have been shaped by epigenetic mechanisms, as in the *ACACA* and *FASN* genes.

## CONCLUSION

The results showed that when the rats were exposed to fructose for 28 days, there were no significant changes in body weight. Regardless of calcium and vitamin D doses, it was found that during the first week of the study there was less live body weight gain

in rats in the FCaD1 and FCaD2 groups than in the Con group, and this difference persisted during the second and third weeks. Effects of short-term calcium-vitamin D intake on energy intake with the diet have shown that they can vary depending on the type of animal, the duration of feeding, and the differences in calcium and vitamin D doses supplemented by the diet. While the hyperlipidemic effect of fructose has been observed to disappear due to dietary doses of calcium and vitamin D, it has not been found to affect plasma glucose, total cholesterol, HDL and LDL levels. It is believed that changes in the expression levels of *ACACA* and *FASN* genes due to calcium-vitamin D supplementation in high-fructose diets may be affected by epigenetic mechanisms. The level of *SREBP-1c* and *SCD-1* gene expression varied depending on the dose of calcium and vitamin D. It has been determined by the changes in the expression levels of *SREBP-1c* and *SCD-1* genes that dietary treatment with calcium and vitamin D supplementation may be a good option against lipogenesis triggered by high fructose diet. Some genes have shown that calcium and vitamin D supplementation against lipogenesis induced by a high fructose diet can have positive effects in a short time. But it is believed that more and longer-term studies are needed to clarify the mechanisms underlying adequate intake of calcium and vitamin D for their anti-obesity and anti-lipogenic effects.

**Conflict of interest:** The authors have no conflicts of interest to report.

**Authors' Contributions:** AY and SÖK contributed to the project idea, design and execution of the study. AY and SÖK contributed to the acquisition of data. AY and SÖK analysed the data. AY drafted and wrote the manuscript. AY and SÖK reviewed the manuscript critically. All authors have read and approved the finalized manuscript.

**Ethical approval:** This study was carried out at Hatay Mustafa Kemal University Experimental Research Practice and Research Center. This research was approved by the Hatay Mustafa Kemal University Local Ethics Board for Animal Experiments (HMKÜ-HADYEK) at the meeting of January 28, 2021 (Decision number: 2021/01-07).

**Acknowledgement:** In this study would like to thank the Hatay Mustafa Kemal University Scientific Research Projects Unit with the study entitled “The Effects of High Calcium and Vitamin D on Fructose-Induced Lipogenesis Pathway in Rats”, Project No: 21.YL.022, for their contributions to the present study and also thank the administration and staff of the Hatay Mustafa Kemal University Experimental Research Practice and Research Center.

**Explanation:** This article is summarized by the first author’s master thesis

## REFERENCES

- Abete, I., Astrup, A., Martínez, J. A., Thorsdottir, I., & Zulet, M. A. (2010). Obesity and the metabolic syndrome: role of different dietary macronutrient distribution patterns and specific nutritional components on weight loss and maintenance. *Nutrition Reviews*, 68(4), 214–231. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00280.x>
- Agame-Lagunes, B., Grube-Pagola, P., García-Varela, R., Alexander-Aguilera, A., & García, HS. (2021). Effect of Curcumin Nanoemulsions Stabilized with MAG and DAG-MCFAs in a Fructose-Induced Hepatic Steatosis Rat Model. *Pharmaceutics*, 13(4), 509. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040509>
- Aragno, M., Tomasinelli, C. E., Vercellinato, I., Catalano, M. G., Collino, M., Fantozzi R., Danni, O., & Boccuzzi G. (2009). SREBP-1c in nonalcoholic fatty liver disease induced by Western-type high-fat diet plus fructose in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(7), 1067–1074. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.016>
- Bantle J. P. (2009). Dietary Fructose and Metabolic Syndrome and Diabetes. *The Journal of Nutrition*, 139(6), 1263S–1268S. <https://doi.org/10.3945/jn.108.098020>
- Bocarsly, M.E., Powell, E.S., Avena, N.M., & Hoebel, B.G. (2010). High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97(1), 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.02.012>
- Chiu, S., Mulligan, K., & Schwarz, J-M. (2018). Dietary carbohydrates and fatty liver disease: de novo lipogenesis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 21(4), 277–282. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000469>
- Das, S., & Choudhuri, D. (2020). Calcium supplementation shows a hepatoprotective effect against high-fat diet by regulating oxidative-induced inflammatory response and lipogenesis activity in male rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 10, 511-519. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2019.06.002>
- Distefano J. K. (2020). Fructose-mediated effects on gene expression and epigenetic mechanisms associated with NAFLD pathogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77, 2079–2090. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03390-0>
- Eckel, R. H., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *The Lancet*, 365(9468), 1415–1428. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66378-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66378-7)
- Flowers, M. T., & Ntambi, J. M. (2008). Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 19(3), 248–256. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3282f9b54d>
- Gathercole, L. L., Morgan, S. A., & Tomlinson, J. W. (2013). Hormonal Regulation of Lipogenesis. *Vitamins & Hormones*, 1–27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407766-9.00001-8>
- Gou, S.-H., Huang, H.-F., Chen, X.-Y., Liu, J., He, M., Ma, Y.-Y., Zhao X.-N., Zhang, Y., & Ni, J.-M. (2016). Lipid-lowering, hepatoprotective, and atheroprotective effects of the mixture Hong-Qu and gypenosides in hyperlipidemia with NAFLD rats. *Journal of the Chinese Medical Association*, 79(3), 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2015.09.002>
- He, Z., Jiang, T., Wang, Z., Levi, M., & Li, J. (2004). Modulation of carbohydrate response element-binding protein gene expression in 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 287(3), E424–E430. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00568.2003>
- Jacquemain, M., Doucet, E., Despres, J. P., Bouchard, C., & Tremblay, A. (2003). Calcium intake, body composition, and lipoprotein-lipid concentrations in adults. *The*

- American Journal of Clinical Nutrition, 77(6), 1448–1552. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.6.1448>
- Kang, E.-J., Lee, J.-E., An, S.-M., Lee, J. H., Kwon, H. S., Kim B. C., Kim S. J., Kim J. M., Hwang D. Y., Jung Y.-J., Yang, S. Y., Kim, S. C., & An, B.-S.** (2015). The effects of vitamin D3 on lipogenesis in the liver and adipose tissue of pregnant rats. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(4), 1151–1158. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2300>
- Kawasaki, T., Igarashi, K., Koeda, T., Sugimoto, K., Nakagawa, K., Hayashi, S., Yamaji, R., Inui, H., Fukusato, T., & Yamanoichi, T.** (2009). Rats Fed Fructose-Enriched Diets Have Characteristics of Nonalcoholic Hepatic Steatosis. *The Journal of Nutrition*, 139(11), 2067–2071. <https://doi.org/10.3945/jn.109.105858>
- Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S. M., Moore, M. C., Renner, S., Woods, S. C., Huypens, P., Beckers, H., de Angelis, M. H., Schürmann, A., Bakhti, M., Klingenspor, M., Heiman, M., Cherrington, A. D., Ristow, M., Lickert, H., Wolf, E., Havel, P. J., Müller, T. D., & Tschöp, M. H.** (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(3), 140–162. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.161>
- Li, P., Chang, X., Fan, X., Fan, C., Tang, T., Wang, R., & Qi, K.** (2018). Dietary calcium status during maternal pregnancy and lactation affects lipid metabolism in mouse offspring. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34520-6>
- Li, P., Yan, K., Chang, X., Chen, X., Wang, R., Fan, X., Tang, T., Zhan, D., & Qi, K.** (2020). Sex-specific maternal calcium requirements for the prevention of nonalcoholic fatty liver disease by altering the intestinal microbiota and lipid metabolism in the high-fat-diet-fed offspring mice. *Gut Microbes*, 11(6), 1590–1607. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1768645>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Maia-Ceciliano, T. C., Dutra, R. R., Aguila, M. B., & Mandarim-De-Lacerda, C. A.** (2019). The deficiency and the supplementation of vitamin D and liver: lessons of chronic fructose-rich diet in mice. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 192, 105399. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105399>
- Mansouri, M., Miri, A., Varmaghani, M., Abbasi, R., Taha, P., Ramezani, S., Rahmani, E., Armaghan, R., & Sadeghi, O.** (2019). Vitamin D Deficiency In Relation to General and Abdominal Obesity Among High Educated Adults. *Eating and Weight Disorders*, 24(1), 83–90. <https://doi.org/10.1007/s40519-018-0511-4>
- Marziou, A., Philouze, C., Couturier, C., Astier, J., Obert, P., Landrier, J.-F., & Riva, C.** (2020). Vitamin D Supplementation Improves Adipose Tissue Inflammation and Reduces Hepatic Steatosis in Obese C57BL/6J Mice. *Nutrients*, 12(2), 342. <https://doi.org/10.3390/nu12020342>
- Melanson, E. L., Sharp, T. A., Schneider, J., Donahoo, W. T., Grunwald, G. K. & Hill J. O.** (2003). Relation between calcium intake and fat oxidation in adult humans. *International Journal of Obesity*, 27(2), 196–203. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.802202>
- Melanson, K. J., Angelopoulos, T. J., Nguyen, V., Zukley, L., Lowndes, J., & Rippe, J. M.** (2008). High-fructose corn syrup, energy intake, and appetite regulation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(6), 1738S–1744S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.25825E>
- Mock, K., Lateef, S., Benedito, V. A., & Tou, J. C.** (2017). High-fructose corn syrup-55 consumption alters hepatic lipid metabolism and promotes triglyceride accumulation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 39, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.09.010>
- Ning, C., Liu, L., Lv, G., Yang, Y., Zhang, Y., Yu, R., Wang, Y., & Zhu, J.** (2015). Lipid metabolism and inflammation modulated by Vitamin D in liver of diabetic rats. *Lipids in Health and Disease*, 14, 31. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0030-5>
- National Research Council. (1995). *Nutrient requirements of laboratory animals*. 4th revised ed.
- Özkan, H., & Yakan A.** (2019). Dietary high calories from sunflower oil, sucrose and fructose sources alters lipogenic genes expression levels in liver and skeletal muscle in rats. *Annals of Hepatology*, 18(5), 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.aohp.2019.03.013>
- Özkan H.** (2018). Yüksek Enerjili Rasyonla Beslenen Ratlarda Lipogenez Yolağındaki Bazı Genlerin Ekspresyon Seviyeleri., Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi.
- Pan, J. H., Cha, H., Tang, J., Lee, S., Lee, S. H., Le, B., Redding, M. C., Kim, S., Batish, M., Kong, B. C., Lee, J. H., & Kim, J. K.** (2021). The role of microRNA-33 as a key regulator in hepatic lipogenesis signaling and a potential serological biomarker for NAFLD with excessive dietary fructose consumption in C57BL/6N mice. *Food & Function*, 12(2), 656–667. <https://doi.org/10.1039/D0FO02286A>

- Papakonstantinou, E., Flatt, W. P., Huth, P. J., & Harris, R. B. S.** (2003). High Dietary Calcium Reduces Body Fat Content, Digestibility of Fat, and Serum Vitamin D in Rats. *Obesity Research*, 11(3), 387–394. <https://doi.org/10.1038/oby.2003.52>
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W.** (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, (6), 1-3. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>
- Rui L.** (2014). Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>
- Santos, B. P. dos, da Costa Diesel, L. F., da Silva Meirelles, L., Nardi, N. B., & Camassola, M.** (2016). Identification of suitable reference genes for quantitative gene expression analysis in rat adipose stromal cells induced to trilineage differentiation. *Gene*, 594(2), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.09.002>
- Sergeev, I. N., & Song, Q.** (2014). High vitamin D and calcium intakes reduce diet-induced obesity in mice by increasing adipose tissue apoptosis. *Molecular Nutrition Food Research*, 58(6), 1342–1348. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300503>
- Shimada M, Ichigo Y, Shirouchi B, Takashima S, Inagaki M, Nakagawa T., & Hayakawa, T.** (2019). Treatment with myo-inositol attenuates binding of the carbohydrate-responsive element-binding protein to the ChREBP- $\beta$  and FASN genes in rat nonalcoholic fatty liver induced by high-fructose diet. *Nutrition Research*, 64, 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.01.002>
- Siddiqui, S. M. K., Chang, E., Li, J., Burlage, C., Zou, M., Buhman, K. K., Koser, S., Donkin, S. S., & Teegarden, D.** (2008). Dietary intervention with vitamin D, calcium, and whey protein reduced fat mass and increased lean mass in rats. *Nutrition Research*, 28(11), 783–790. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.08.004>
- Softic, S., Cohen, D. E., & Kahn, C. R.** (2016). Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(5), 1282–1293. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4054-0>
- Song, Q., & Sergeev, I. N.** (2012). Calcium and vitamin D in obesity. *Nutrition Research Reviews*, 25(1), 130–141. <https://doi.org/10.1017/S0954422412000029>
- Tappy, L., & Le, K.-A.** (2010). Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. *Physiological Reviews*, 90, 23–46. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2009>
- Teegarden D.** (2005). The Influence of Dairy Product Consumption on Body Composition. *The Journal of Nutrition*, 2749-2752. <https://doi.org/10.1093/jn/135.12.2749>
- Thacher, T. D. & Clarke, B. L.** (2011). Vitamin D Insufficiency. *Mayo Clinic Proceedings*, 86(1), 50–60. <https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0567>
- Yasari, S., Prud'homme, D., Wang, D., Jankowski, M., Levy, É., Gutkowska, J., & Lavoie, J.-M.** (2010). Exercise training decreases hepatic SCD-1 gene expression and protein content in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 335(1-2), 291–299. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0279-y>
- Yin, Y., Yu, Z., Xia, M., Luo, X., Lu, X., & Ling, W.** (2012). Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. *European Journal of Clinical Investigation*, 42(11), 1189–1196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2012.02706.x>
- Zarghani, S. S., Soraya, H., & Alizadeh, M.** (2016). Calcium and vitamin D3 combinations improve fatty liver disease through AMPK-independent mechanisms. *European Journal of Nutrition*, 57, 731–740. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1360-4>
- Zhang, Q., & Tordoff, M. G.** (2004). No effect of dietary calcium on body weight of lean and obese mice and rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(4), R669–R677. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00655.2003>
- Zhang, F., Ye, J., Zhu, X., Wang, L., Gao, P., Shu, G., Jiang, Q., & Wang, S.** (2019). Anti-Obesity Effects of Dietary Calcium: The Evidence and Possible Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 3072. <https://doi.org/10.3390/ijms20123072>
- Zhu, W., Cai, D., Wang, Y., Lin, N., Hu, Q., Qi Y., Ma S., & Amarasekara S.** (2013). Calcium plus vitamin D3 supplementation facilitated Fat loss in overweight and obese college students with very-low calcium consumption: a randomized controlled trial. *Nutrition Journal*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2891-12-8>

## Comparative Analysis of Phenolic Compounds in Honey and *Momordica charantia* Linn

Nilay KEYVAN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Hygiene and Technology, Institute of Health Sciences, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, Türkiye

### ABSTRACT

Phenolic compounds are bioactive constituents in honey and *Momordica charantia*, contributing to their potential health benefits. Honey, a natural sweetener, contains phenolic acids, flavonoids, and other minor phenolic contents, contributing to its antioxidant activity and potential therapeutic properties. In this study, the High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique was utilized to determine the phenolic content of *Momordica charantia* Linn and honey. The analysis of *Momordica charantia* Linn demonstrated that it showed the highest level of p-hydroxy benzoic acid, whereas the lowest quantity of p-coumaric acid was detected. Rutin was identified as the primary constituent in the composition of honey, whereas o-coumaric acid was detected in the lowest concentration. In conclusion, it can be concluded that *Momordica charantia* Linn and honey possess a significant abundance of phenolic compounds.

**Keywords:** Bitter melon, honey, *Momordica charantia* Linn, phenolic compounds

\*\*\*

### Bal ve *Momordica charantia* Linn'deki Fenolik Bileşiklerin Karşılaştırmalı Analizi

#### ÖZ

Fenolik bileşikler, hem balda hem de *Momordica charantia*'da bulunan ve potansiyel sağlık yararına katkıda bulunan biyoaktif bileşenlerdir. Doğal bir tatlandırıcı olan bal, antioksidan aktivitesine ve potansiyel tedavi edici özelliklerine katkıda bulunan fenolik asitleri, flavonoidleri ve diğer küçük fenolik içerikleri içerir. Bu çalışmada *Momordica charantia* Linn ve balın fenolik içeriğini belirlemek için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) tekniğinden yararlanılmıştır. *Momordica charantia* Linn'in analizi, en yüksek düzeyde p-hidroksi benzoik asit içerdiğini, en düşük miktarda ise p-kumarik asitin tespit edildiğini göstermiştir. Balın bileşiminde rutin birincil bileşen olarak tanımlanırken, en düşük konsantrasyonda o-kumarik asit tespit edilmiştir. Sonuç olarak *Momordica charantia* Linn ve balın önemli miktarda fenolik bileşik içerdiği sonucuna varılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Bal, fenolik bileşikler, kudret narı, *Momordica charantia* Linn

To cite this article: Keyvan N. Comparative Analysis of Phenolic Compounds in Honey and *Momordica charantia* Linn: Exploring Health Aspects. Kocatepe Vet J. (2023);16(4):556-562.

Submission: 27.09.2023 Accepted: 30.11.2023 Published Online: 13.12.2023

ORCID ID: NK: 0000-0002-6717-2793

\*Corresponding author e-mail: [nilaykeyvan@gmail.com](mailto:nilaykeyvan@gmail.com)

## INTRODUCTION

The *Momordica charantia* plant, known as bitter melon or bitter gourd, is a flowering plant species belonging to *Cucurbitaceae* (Giuliani et al. 2016). This plant is widely used in traditional medicine. Due to its possible biological effects, the number of studies assessing its pharmacological activities has increased recently (Pundir and Chandel 2021). One of the components contributing to the health beneficial effects of *M. charantia* is phenolic compounds (Haque et al. 2011). Phenolic compounds are a class of secondary metabolites abundant in various plant species and known for their remarkable antioxidant and various other bioactive properties, including antibacterial activity (Qader et al. 2011). Numerous studies have examined its polyphenolic composition and potential biological properties for human well-being. Various extraction methods have been developed to obtain high amounts of polyphenolic compounds. Previous studies have shown that some extraction methods applied to bitter melon significantly increase the amount of phenolic compounds in the extract and, therefore, the antioxidant capacity (Ng and Kuppasamy 2019). The relationship between the phenolic content and antioxidant activity of extracts from *M. charantia* Linn suggests that phenolic compounds probably have a significant impact on its capacity to scavenge free radicals and reduce oxidative stress (Kubola and Siriamornpun 2008; Qader et al. 2011). Numerous researches have provided evidence suggesting that it has antimicrobial activity (Sood et al. 2012). In addition to its antimicrobial properties, *M. charantia* Linn has been reported to have antidiabetic, wound-healing, and immunomodulatory activities (Prasad et al. 2006; Meng et al. 2012; Tan et al. 2016). Additionally, the number of studies examining the effects of bitter melon on cancer has started to increase recently (Yasui et al. 2005; Semiz and Sen 2007; Dia and Krishnan 2016).

Honey, a naturally occurring sweet substance, has gained extensive usage as a dietary commodity due to its potential for promoting health and well-being. Current research has emphasized honey's impact on cognitive function, specifically exploring its ability to enhance memory, defend against neurological

damage, alleviate stress, and reduce pain sensitivity (Zamri et al. 2023). Furthermore, it has been found that honey has a regulatory influence on the microbiota in the human gastrointestinal tract, facilitating the proliferation of advantageous bacteria while inhibiting the growth of potentially harmful microorganisms (Jiang et al. 2020). The antioxidant properties of honey are ascribed to the existence of phenolic compounds, which facilitate the neutralization of detrimental free radicals and the alleviation of oxidative damage (Moniruzzaman et al. 2013). Furthermore, honey has been found to exhibit immunomodulatory effects, particularly in the context of skin disorders. Research studies have demonstrated that honey possesses the ability to inhibit the proliferation of bacteria that are of significance in the field of dermatology, as well as influence immunological factors associated with the skin's immune system (McLoone et al. 2015). This study aims to provide an analysis of the phenolics found in honey and *Momordica charantia*, with a particular focus on their varied health benefits and potential therapeutic applications.

## MATERIALS and METHODS

### Providing materials

The honey and *Momordica charantia* were bought at a local market in the Burdur Province of Turkey. Twenty-three standard phenolics (Table 1) were obtained from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO) to serve as standards in the HPLC analysis of individual phenolics.

### Phenolic content analysis

The phenolic contents of *Momordica charantia* Linn and honey were evaluated using high-performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu, Japan) with the conditions specified in Table 2 (Horax et al., 2010). The bitter melon fruits and honey samples were subjected to HPLC analysis following the methods described by Horax et al. (2010) and Estevinho et al. (2008).

**Table 1.** Phenolic contents of *Momordica charantia* Linn and honey.

Phenolic compounds	<i>Momordica charantia</i> Linn	Honey
Gallic Acid	1.9	*
Protocatechic Acid	*	*
Catechin	*	*
p-hydroxy benzoic acid	6.7	*
Chlorogenic acid	0.8	2.6
Caffeic acid	0.2	0.5
Epicatechin	*	*
Syringic Acid,	0.3	0.2
Vanilin	*	*
p-coumaric acid,	0.05	0.3
Ferulic acid,	*	0.5
Sinapinic acid,	*	*
Benzoic acid,	*	0.7
o-coumaric acid,	*	0.1
Rutin	*	9.7
Hesperidin	*	0.2
Rosmarinic acid,	*	*
Eriodictiol	*	*
Cinnamic acid	0.1	0.2
Quercetin	0.5	1.8
Luteolin	0.3	1.3
Kamferol	1.1	1.1
Apigenin	*	*

\*"Non detected"

**Table 2.** The high-performance liquid chromatography (HPLC) parameters used for the analysis of phenolic content.

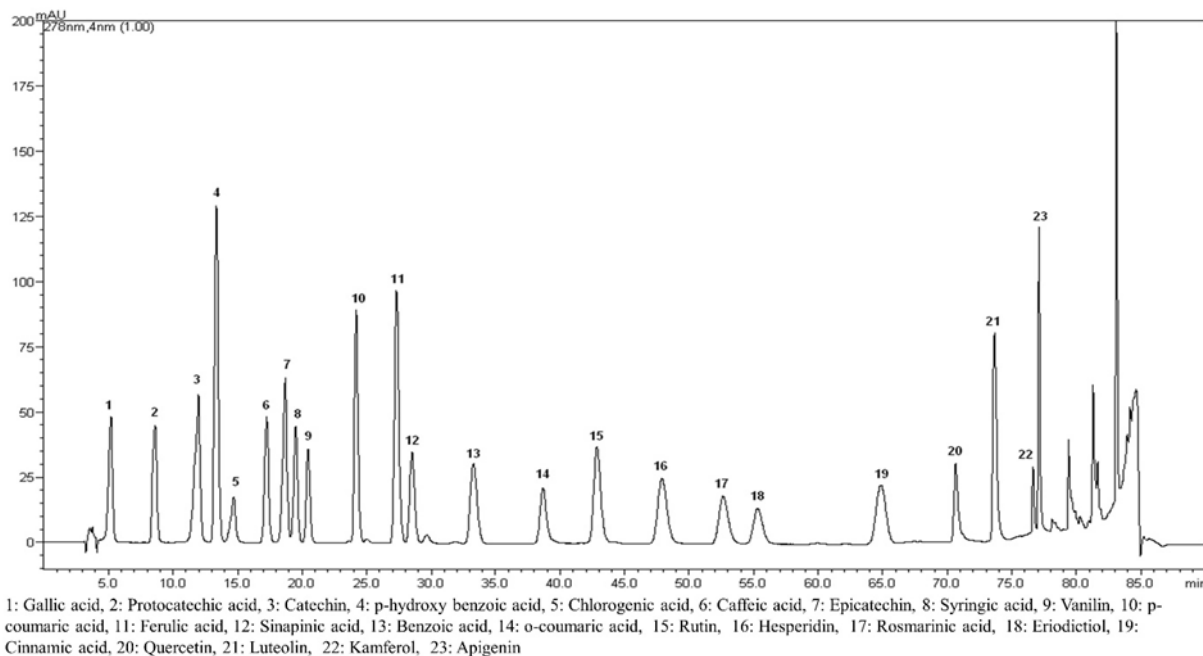
Condition	Settings
Dedector	SPD-M 10A vp DAD dedector ( $\lambda_{\max}=278\text{nm}$ )
Auto sampler	SIL-10AD vp
System controller	SCL-10Avp
Pump:	LC-10ADvp
Degasser	DGU- 14A
Column oven:	CTO-10Avp
Column	Agilent Eclipse XDB-C18 (250 × 4.60 mm) 5-micron
Column temperature	30°C
Mobile phase	A: 3% acetic acid, B: methanol
Injection Volume	20 $\mu\text{l}$
Flow Rate	0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$



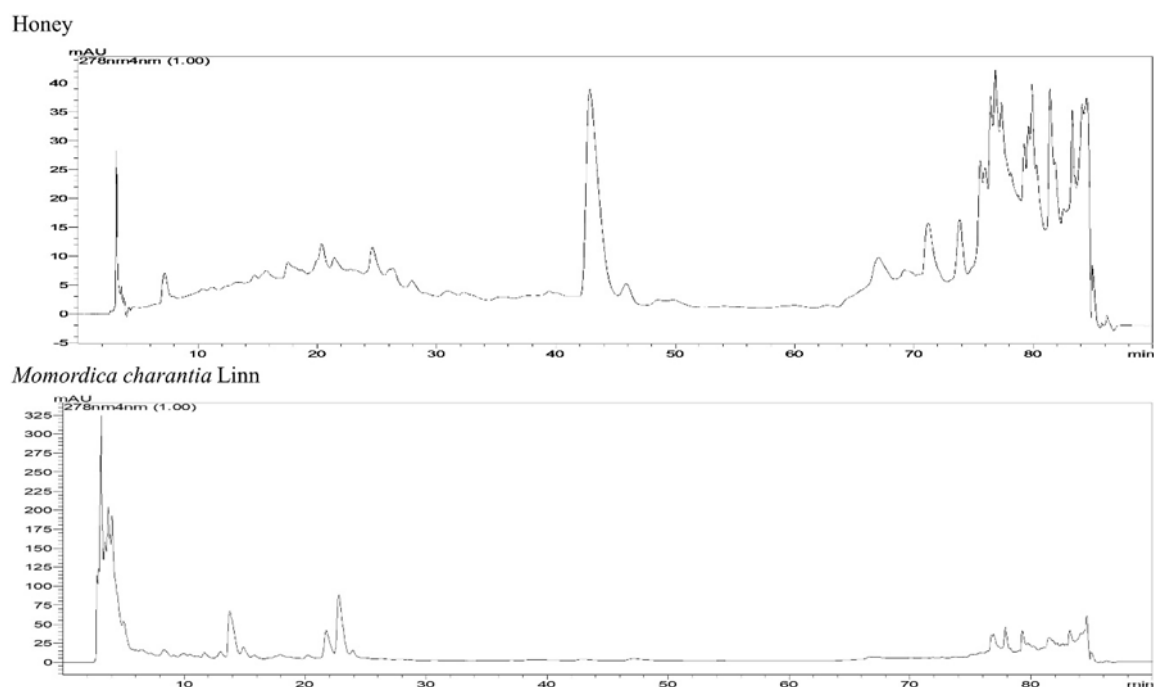
## RESULTS

The phenolic composition of bitter melon and honey is presented in Table 1. The analysis of *Momordica charantia* Linn revealed that it had the highest concentration of p-hydroxy benzoic acid, while the lowest quantity of p-coumaric acid was detected. The

predominant component in honey composition was rutin, while o-coumaric acid was found in the lowest concentration. Figure 1 indicates the chromatogram of standards, and Figure 2 shows the chromatogram of *Momordica charantia* Linn and honey.



**Figure 1:** The chromatogram of standards



**Figure 2:** The chromatogram of *Momordica charantia* Linn and honey

## DISCUSSION

Phenolic compounds are a class of bioactive chemicals renowned for their antioxidative characteristics and prospective contributions to human health. *Momordica charantia* Linn, commonly called bitter melon or bitter gourd, has been the subject of much research due to its abundance of phenolic compounds and the subsequent health benefits they may provide. Numerous evaluations have been reported to investigate the phenolic compounds present in *Momordica charantia* Linn by utilizing High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). (Sagor et al. 2015; Huang et al. 2015; Kenny et al. 2013; Tan et al. 2014; Busuioc et al. 2020). Numerous phenolic compounds, including p-hydroxy benzoic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, sinapinic acid, cinnamic acid, quercetin, luteolin, and kamferol, have been identified in *Momordica charantia* through these investigations. For instance, Sagor et al. (2015) analyzed the phenolic compounds in *Momordica charantia* Linn and found abundant quantities of ellagic acid and myricetin. In their study, Huang et al. (2015) analyzed the chemical composition of *Momordica charantia* Linn leaves and detected ten phenolic compounds. A study has demonstrated the occurrence of diverse phenolics, like quinic acid, quinic acid, and catechin, in *Momordica charantia* (Kenny et al. 2013). These studies propose scientific evidence for phenolic chemicals in *Momordica charantia*. The antioxidant activity of phenolic compounds has been demonstrated, indicating its potential to reduce oxidative stress and prevent the development of many diseases (Sagor et al. 2015). The capacity of phenolic compounds to eliminate free radicals and prevent oxidative damage is responsible for their antioxidant action (Garcia et al. 2020). Furthermore, it has been documented that phenolic compounds possess anti-inflammatory, antibacterial, and anticancer characteristics (Owusu et al. 2021; Muronga et al. 2021). Honey includes many phenolic compounds (Estevinho et al. 2008). Chlorogenic acid, a common phenolic molecule, is abundantly present in coffee beans and is recognized for its notable antioxidant properties (Nardini et al. 2002). It can also be found in honey and has been demonstrated to have advantageous impacts on human well-being (Sato et al. 2011). Caffeic acid, a chlorogenic acid derivative, is a phenolic molecule detected in honey and has demonstrated a higher level of antioxidant activity than chlorogenic acid (Sato et al. 2011). These substances have been documented to demonstrate antioxidant and antibacterial properties and possess antioxidant capacity (Estevinho et al. 2008; Huang et al. 2012). Additionally, it has been documented that quercetin and luteolin possess antioxidant and antibacterial properties (Sarker and Oba 2019). In general, the existence of these phenolic chemicals

inside honey contributes to enhancing its antioxidant and antibacterial characteristics. The antioxidant potential of honey is dependent on the quantity of phenolic compounds, whereas black honey often exhibits more activity compared to clear honey (Estevinho et al. 2008). These substances also contribute to the biological activity exhibited by honey, including its antibacterial and wound-healing qualities (Wadi 2022).

## CONCLUSION

In conclusion, *Momordica charantia* Linn is a plant species that contains various phenolic compounds. Phenolic compounds in *Momordica charantia* are responsible for their antioxidant properties and potential health benefits. In this study, various phenolic components were detected in honey. These substances are responsible for honey's antioxidant, antibacterial, and other biological actions. Additional investigation is required to comprehensively comprehend the mechanisms of action and potential health advantages associated with the phenolic chemicals in honey and *Momordica charantia*.

**Funding:** This research received no external funding.

**Conflict of interest:** The authors have no conflicts of interest to report.

**Authors' Contributions:** NK contributed to the project idea, design and execution of the study. NK, contributed to the acquisition of data. NK analysed the data. NK, drafted and wrote the manuscript. NK, reviewed the manuscript critically. All authors have read and approved the finalized manuscript.

**Ethical approval:** "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."

## REFERENCES

- Busuioc, A., Botezatu, A., Furdui, B., Vinătoru, C., Maggi, F., Caprioli, G., & Dinica, R. (2020). Comparative Study Of the Chemical Compositions And Antioxidant Activities Of Fresh Juices From Romanian Cucurbitaceae Varieties. *Molecules*, 22(25), 5468-5485. <https://doi.org/10.3390/molecules25225468>
- Dia, V. P., & Krishnan, H. B. (2016). BG-4, a novel anticancer peptide from bitter gourd (*Momordica charantia*), promotes apoptosis in human colon cancer cells. *Scientific Reports*, 6(1), 33532. <https://doi.org/10.1038/srep33532>

- Estevinho, L., Pereira, A., Moreira, L., Dias, L., & Pereira, E. (2008). Antioxidant and Antimicrobial Effects of Phenolic Compounds Extracts of Northeast Portugal Honey. *Food and Chemical Toxicology*, 12(46), 3774-3779. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.062>
- Giuliani, C., Tani, C., & Maleci Bini, L. (2016). Micromorphology and anatomy of fruits and seeds of bitter melon (*Momordica charantia* L., Cucurbitaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 85(1), 1-7. <https://doi.org/10.5586/asbp.3490>
- Haque, M. E., Alam, M. B., & Hossain, M. S. (2011). The efficacy of cucurbitane type triterpenoids, glycosides and phenolic compounds isolated from *Momordica charantia*: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(5), 1135-1146.
- Horax, R., Hettiarachchy, N., & Chen, P. (2010). Extraction, quantification, and antioxidant activities of phenolics from pericarp and seeds of bitter melons (*Momordica charantia*) harvested at three maturity stages (immature, mature, and ripe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4428-4433. <https://doi.org/10.1021/jf9029578>
- Huang, W., Tsai, T., Huang, C., Li, Y., Chyuan, J., Chuang, L., & Tsai, P. (2015). Inhibitory Effects of Wild Bitter Melon Leaf Extract On Propionibacterium Acnes-induced Skin Inflammation In Mice and Cytokine Production In Vitro. *Food and Function*, 8(6), 2550-2560. <https://doi.org/10.1039/c5fo00550g>
- Huang, W., Zhang, H., Liu, W., & Li, C. (2012). Survey of Antioxidant Capacity and Phenolic Composition of Blueberry, Blackberry, and Strawberry In Nanjing. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2(13), 94-102. <https://doi.org/10.1631/jzus.b1100137>
- Jiang, L., Xie, M., Chen, G., Qiao, J., Zhang, H., & Zeng, X. (2020). Phenolics and Carbohydrates In Buckwheat Honey Regulate The Human Intestinal Microbiota. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (2020), 1-11. <https://doi.org/10.1155/2020/6432942>
- Kenny, O., Smyth, T. J., Hewage, C. M., & Brunton, N. P. (2013). Antioxidant properties and quantitative UPLC-MS analysis of phenolic compounds from extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and bitter melon (*Momordica charantia*) fruit. *Food Chemistry*, 141(4), 4295-4302. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.016>
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chemistry*, 110(4), 881-890. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.076>
- McLoone, P., Warnock, M., & Fyfe, L. (2015). Honey: An Immunomodulatory Agent for Disorders of the Skin. *Food and Agricultural Immunology*, 27(3), 338-349. <https://doi.org/10.1080/09540105.2015.1104653>
- Meng, Y.; Liu, B.; Lei, N.; Zheng, J.; He, Q.; Li, D.; Zhao, X.; & Shen, F (2012). Alpha-momorcharin possessing high immunogenicity, immunotoxicity and hepatotoxicity in SD rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 139, 590–598. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.057>
- Moniruzzaman, M., Khalil, I., Sulaiman, S., & Gan, S. (2013). Physicochemical and Antioxidant Properties of Malaysian Honeys Produced By Apis Cerana, Apis Dorsata and Apis Mellifera. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 13, 43. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-43>
- Muronga, M., Quispe, C., Tshikhudo, P., Msagati, T., Mudau, F., Sureda, A., & Sharifi-Rad, J. (2021). Three Selected Edible Crops Of the Genus *Momordica* As Potential Sources Of Phytochemicals: Biochemical, Nutritional, And Medicinal Values. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 1-19. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.625546>
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., & Scaccini, C. (2002). Absorption of Phenolic Acids In Humans After Coffee Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5735-5741. <https://doi.org/10.1021/jf0257547>
- Ng, Z., & Kuppusamy, U. (2019). Effects of Different Heat Treatments on the Antioxidant Activity and Ascorbic Acid Content of Bitter Melon, *Momordica charantia*. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22, 1-9. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.28318>
- Sarker, S., & Oba, S. (2019). Antioxidant Constituents of Three Selected Red and Green Color Amaranthus Leafy Vegetable. *Scientific Reports*, 9, 18233. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52033-8>
- Owusu, E., Ahorlu, M., Afutu, E., Akumwena, A., & Asare, G. (2021). Antimicrobial Activity of Selected Medicinal Plants From a Sub-saharan African Country Against Bacterial Pathogens From Post-operative Wound Infections. *Medical Sciences*, 9(2), 23-39. <https://doi.org/10.3390/medsci9020023>
- Prasad, V.; Jain, V.; Girish, D.; & Dorle, A.K. (2006). Wound-healing property of *Momordica charantia* L. fruit powder. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 6, 105–115. [https://doi.org/10.1080/J157v06n03\\_05](https://doi.org/10.1080/J157v06n03_05)
- Pundir, V., & Chandel, A. (2021). *Momordica Charantia* Constituents and The Anti-proliferative Activity Against An Ovarian Cancer Cell-line Skov-3. *Flora and Fauna*, 27(2), 185-190. <https://doi.org/10.33451/floraf fauna.v27i2pp185-190>
- Qader, S., Abdulla, M., Chua, L., Najim, N., Zain, M., Hamdan, S. (2011). Antioxidant, Total Phenolic Content and Cytotoxicity Evaluation of Selected Malaysian Plants. *Molecules*, 16(4), 3433-3443. <https://doi.org/10.3390/molecules16043433>
- Sagor, A., Chowdhury, M., Tabassum, N., Hossain, H., Rahman, M., Alam, A. (2015). Supplementation of Fresh Ucche (*Momordica Charantia* L. Var. *Muricata* Willd) Prevented Oxidative Stress, Fibrosis and Hepatic Damage In Ccl4 Treated Rats. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 15(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0636-1>
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., & Iseki, K. (2011). In Vitro and In Vivo Antioxidant Properties of Chlorogenic Acid and Caffeic Acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1-2), 136-138. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.035>
- Semiz, A.; & Sen, A. (2007). Antioxidant and chemoprotective properties of *Momordica charantia* L. (bitter melon) fruit extract. *African Journal of Biotechnology*, 6, 273–277.
- Sood A, Kaur P, & Gupta R. (2012). Phytochemical screening and antimicrobial assay of various seeds extract of Cucurbitaceae family. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 3, 401–409.
- Tan, S. P., Kha, T. C., Parks, S. E., & Roach, P. D. (2016). Bitter melon (*Momordica charantia* L.) bioactive composition and health benefits: A review. *Food Reviews International*, 32(2), 181-202.

- Tan, S., Stathopoulos, C., Parks, S., & Roach, P. (2014).** An Optimised Aqueous Extract of Phenolic Compounds From Bitter Melon With High Antioxidant Capacity. *Antioxidants*, 4(3), 814-829. <https://doi.org/10.3390/antiox3040814>
- Wadi, M. (2022).** Bioactivity and Chemical Characterization of Sudanese Bee Honey: Crude Acacia And Its Organic Extracts. *BioMed Research International*, (2022), 1-9. <https://doi.org/10.1155/2022/8441239>
- Yasui, Y.; Hosokawa, M.; Sahara, T.; Suzuki, R.; Ohgiya, S.; Kohno, H.; Tanaka, T.; Miyashita, K. (2005).** Bitter gourd seed fatty acid rich in 9c,11t,13t-conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPAR $\gamma$  in human colon cancer Caco-2 cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 73, 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2005.04.013>
- Zamri, N., Ghani, N., Ismail, C., Zakaria, R., Shafin, N. (2023).** Honey on Brain Health: a Promising Brain Booster. *Front. Aging Neurosci.*, 14, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.1092596>

## Evaluation of Poisoning Cases in The Emergency Department

Selen BÜYÜKÇAVUŞOĞLU<sup>1</sup>, Yavuz Osman BİRDANE<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Afyonkarabısar Provincial Directorate of Health, Pharmacist, Afyonkarabısar, Türkiye

<sup>2</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarabısar, Türkiye

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the demographic characteristics and compare results with the literature, referring the cases of intoxication admitted to the Uşak University Medical Faculty Education and Research Hospital. 1027 cases with the diagnosis of intoxication between the years 2015-2017 were evaluated in the terms of age, gender, the month they applied, season, place of residence, type of poisoning, type of medication, treatment methods, duration of hospital stay whether or not antidotes were used. In this study, 1027 patients with the diagnosis of intoxication were examined. Of the 1027 patients, 583 were female (56,8%) and 444 were male (43,2%). The most common cases of poisoning were found in the 21-30 age group. Most cases of poisoning occurred in spring. The months with the highest number of intoxications are May and April. In May, 10,9% and in April, 9,4% respectively. Of the 1027 cases, 673 were referred from the city center (65,5%), 205 from the village (20%) and 149 from the district (14,5%). Most applications were observed between 19.00-24.00. 58,4% of poisonings were caused by drugs. 40% of the cases were accidents and 60% were suicides. 61,9% of all suicide cases were female and 38,1% were male. As a result, in young children and the elderly, accidental poisoning is observed, but at young ages, especially suicidal drugs are seen. In order to prevent and treat intoxication, it is important to define the epidemiological data of each community by making such studies in societies.

**Keywords:** Antidote, emergency department, intoxication, treatment

\*\*\*

### Acil Servise Gelen Zehirlenme Vakalarının Değerlendirilmesi

#### ÖZ

Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim Araştırma Hastanesi Acil Servisine başvuran zehirlenme olguları ile ilgili demografik özellikleri değerlendirmek ve literatürle karşılaştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada 2015-2017 yılları arasında zehirlenme tanısıyla başvuran 1027 olgu yaş, cinsiyet, başvurdıkları ay, mevsim, yerleşim yerleri, zehirlenme tipi, alınan ilaç türü, uygulanan tedavi yöntemleri, hastanede yatış süreleri, antidot kullanıp kullanılmadığı gibi demografik özellikleri bakımından değerlendirildi. Çalışmada zehirlenme tanısıyla başvuru yapan 1027 hasta incelenmiştir. Hastaların 583'ü kadın (%56,8), 444'ünün (%43,2) erkek hasta olmuştur. En sık zehirlenme vakasına 21-30 yaş arasındaki bireylede rastlandı. Zehirlenme vakaları en çok ilkbahar mevsiminde görülmüştür. En fazla görüldüğü aylar Mayıs ve Nisan aylarıdır. Mayıs ayında %10,9, nisan ayında %9,4 oranında başvuru olmuştur. Vakaların 673'ü il merkezinden (%65,5), 205 hasta köyden (%20) ve 149 hasta ilçeden (%14,5) başvurmuştur. En çok başvurunun 19.00-24.00 saatleri arasında olduğu görülmüştür. Zehirlenmelerin %58,4'ü ilaç kaynaklıydı. İlaç kaynaklı zehirlenmelerin %40'ı kaza, %60'ı intihar amaçlı kullanıma bağlı idi. Tüm intihar olgularının %61,9'u kadın ve %38,1'i erkektir. Sonuç olarak bu retrospektif çalışma Türkiye'deki zehirlenme vakalarıyla ilgili yapılan diğer çalışmalarla benzer bulgular göstermektedir. Küçük çocuklarda ve yaşlılarda genel olarak kaza ile zehirlenme görülürken, genç yaşlarda özellikle intihar amaçlı ilaç alımı sonucunda zehirlenmeler görülmektedir. Zehirlenmelerin önlenmesi ve tedavisi için toplumlarda bu tarz çalışmaların yapılarak her toplumun epidemiyolojik verilerinin tanımlanması önem taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Acil servis, antidot, tedavi, zehirlenme

To cite this article: Büyükcavuşoğlu S. Birdane Y.O. Evaluation of Poisoning Cases in The Emergency Department. Kocatepe Vet J. (2023):16(4): 563-573

Submission: 10.10.2023 Accepted: 11.12.2023 Published Online: 13.12.2023

ORCID ID; SB: 0009-0001-0329-7116, YOB: 0000-0003-0754-7909

\*Corresponding author e-mail: [ybirdane@aku.edu.tr](mailto:ybirdane@aku.edu.tr)

## GİRİŞ

Zehirlenmeler, başta gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere büyük bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Son yıllarda tarım, sağlık ve endüstriyel teknoloji alanındaki büyük gelişmeler nedeniyle yeni zehirlerin ortaya çıkmasıyla da akut zehirlenme profilinde önemli değişiklikler olmuştur (Jailkhani ve ark. 2014).

Gelişmekte olan ülkelerdeki erişkin bireylere bakıldığında kaza veya intihar amacıyla olan akut zehirlenmelerin oranı 10000'de 2-93 civarındadır. Son yıllarda özellikle Batı Avrupa ve Güney Amerika'da ilaç kullanımına bağlı zehirlenmelerdeki artış nedeniyle bu oran gün geçtikçe arttığı görülmektedir. Zehirlenmeler, mesleki maruziyet sonucu veya devamlı ilaç kullanımını gerektiren durumlarda, ilacın yan etkilerine bağlı olarakta gelişebilir. ABD'de 2002 yılında, zehirlenme merkezlerine 2 milyondan fazla zehirlenme nedeniyle başvuru yapıldığı bildirilmiştir. Ülkemizde ise yılda 150 bin zehirlenme vakası ile acil servislere başvuru yapıldığı tahmin edilmektedir (Erdogan ve ark. 2013).

Türkiye'de yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre, acil servise başvuruların tümü değerlendirildiğinde % 0,7-5,0'ını zehirlenme vakalarının oluşturduğu ortaya koyulmuştur. Özellikle 6 yaş altındaki çocuklarda kaza ile zehirlenmelerle daha sık karşılaşılırken, ruhsal değişimin olduğu ergenlik döneminde intihar amaçlı zehirlenmelerle de daha fazla karşılaşmaktadır (Deniz ve ark. 2009). Çocuklarda kazara zehirlenmelerin nedeni ise genelde çocukların yeni şeyler keşfetmeye çalışmaları veya yetişkinleri takip etmeye çalışmalarından kaynaklanmaktadır (Sawalha ve ark. 2010).

Zehirlenme olguları, klinik olarak nörolojik semptomlardan (şuur değişiklikleri, nöbet, koma), gastrointestinal sistem semptomları (bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal) ve kalp semptomlarına (aritmisi, göğüs ağrısı, kardiyak arrest) kadar değişken klinik özelliklere sahip olabilir. Bu semptom ve bulgular toksik maddenin yapısı, etkinliği ve müdahaleye başlanma süresiyle değişebilir (Kadiroğlu ve ark. 2013). İlaçlara bağlı zehirlenmelerde ölüm kısmen daha düşük iken, genellikle intihar amacıyla kullanılan pestisitlerde ölümler artmakta ve yılda 300000 kişinin dünyada bu nedenle öldüğü tahmin edilmektedir (Gunnell and Eddleston 2003).

Acil durum birimlerine en sık başvuru intihar ve kaza sonucu görülen zehirlenmeler nedeniyle olmaktadır. ABD'de zehirlenme oranı 2011 yılında 479/100000 iken, zehirlenmeye bağlı ölüm oranı ise 2010 yılında 17/100000 olarak bildirilmiştir (Koçlu ve ark. 2014).

Türkiye'de karşılaşılan akut zehirlenme etkenlerinden en sık görülenleri; beşeri ilaçlar (antiepileptik, antidepressan, antihipertansif, analjezik, antihistaminik vb.), tarım ilaçları, evde kullanılan çeşitli kimyasallar, zehirli gazlar, bitki ve besinlerin içindeki zehirli maddeler (mantarlar), yılan, akrep ve örümcek gibi çeşitli zehirli hayvanların ısırma ve sokmalarıdır (Tunçok ve Kalyoncu 2007).

İlaç kaynaklı zehirlenmeler; zehirlenme sebepleri arasında ilk sırayı ilaçla zehirlenme almaktadır. Özellikle parasetamol, salisilat ve trisiklik antidepressanlar ile zehirlenme oldukça sık görülmektedir. Tüm dünyada 1950'den bu yana kullanılan parasetamol, fenasetinin bir metabolitidir. Sık kullanılmasıyla birlikte, yüksek doz alımların olması fazlaca zehirlenmesi ile karşılaşmaktadır. Özellikle zehirlenmesinin fazlaca görülmesinin sebeplerinden biri karaciğer üzerine olan etkilerindedir (Karaman ve ark. 2016). Salisilat ve triksiklik anti depresanlarla zehirlenmeleri de acil servislere sık karşılaşılan ilaç zehirlenmelerinden biridir. Genel olarak akut alımlarda görülmekte ancak sık kullanılan ilaçlar oldukları için kronik alımlarda da tekrarlayan dozlarla bağlı olarakta görülebilmektedir. Triksiklik anti depresanların 10 mg.kg<sup>-1</sup> dan daha yüksek dozda alınması ölüme neden olabilecek zehirlenmeye neden olurken, 1 g veya daha üstünde alımlarda ise genellikle ölüm görülür (Şen ve Orak 2015).

Gıda kaynaklı zehirlenmeler; mantar zehirlenmelerinde dünyanın birçok yerinde yaygın olarak görülür. Doğada yaklaşık olarak 5000 mantar türü bulunmaktadır (Ecevit ve ark. 2004). Özellikle Türkiye'de yağışlı geçen bahar ayları, %90'dan fazla ölüme neden olan Amanita türü mantarlar gibi normalde üremeyen zehirli mantarların üremesine neden olmaktadır. Mantar zehirlenmelerinin erken belirtilerinde karın ağrısı, bulantı, kusma, ishal, taşikardi, hiperglisemi, hipotansiyon ve elektrolit dengesizliğidir (Kol ve ark. 2004). Zehirlenme semptomları ortaya çıktığında hasta hemen yatırılmalı ve mümkünse erken tedavi yaklaşımının belirlenmesinde önemli olan serum alfa amanitin düzeyine bakılmalıdır. Erken tedavide asıl amaç mide ve barsaklarda bulunan toksinlerin emilmeden vücuttan uzaklaştırılmasıdır (Ergüven ve ark. 2004).

Kimyasal maddeler ile zehirlenme; zehirlenmelerin nedenlerinden biriside karbon monoksit (CO) gazıdır. Karbon kaynaklı yakıtların iyi yanmaması sonucu ortaya çıkan CO, motorlu araç eksoz gazları, yangınlardan kaynaklanan dumanlar, gaz gücüyle çalışan motorlar, orman yangınları ve metilen klorür içeren boyalardaki CO, akut ve kronik zehirlenmelere neden olmaktadır (Kandış ve ark. 2009). Isınmada kullanılan yakıtların uygun niteliklerde olmaması ve halkın zehirlenme hakkında yeterli bilince sahip olmaması nedeniyle karbonmonoksit zehirlenmeleri daha çok kış mevsiminde görülmektedir (Giniş ve ark. 2014). Karbonmonoksit, hemoglobine (Hb) hızlıca bağlanarak, Hb'deki oksijen ile kolayca yer değiştirerek, karboksihemoglobin (COHb) oluşturur ve oksijen dokulara sunulamaz böylece doku hipoksisine sebep olur. Acil servise başvuru nedenlerinden biriside metanol zehirlenmesidir. Yasa dışı yollarla metanolden üretilmiş alkollerin tüketilmesine bağlı kazara veya metanolün intihar amacıyla alınmasında da görülebilir. Metanol, alkol dehidrogenaz tarafından formaldehite çevrilererek, daha sonra formik asite dönüşür.

Zehirlenmenin nedeni oluşan formaldehid ve formik asittir. Zehirlenme sonucunda; karnın üst bölgesinde ağrı, ishal, ciddi kusmalar, görme bozuklukları, baş ağrısı, fotofobi, beyin ödemi, kardiyak ve solunum yetersizliği, koma ve ölüm gelişir (Baydın ve ark. 2010). Tarım ilaçları (pestisidler) kaynaklı zehirlenmeler; acil servise zehirlenme nedeniyle başvuran hastalar arasında, pestisitten zehirlenmelerin oranı yüksektir. İntihar amaçlı kullanılmayan yaklaşık %30'u ölümlerle sonuçlanmaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde en sık zehirlenme nedenlerinden birisidir (Güven 2004). Amerika Zehir Kontrol Merkezleri Birliği'nin 2007 raporuna göre zehirlenme vakalarının %3,9'unu pestisit zehirlenmesi oluşturmaktadır. Ayrıca bu oran 19 yaş üzeri hastalarda %5,2'ye çıkmaktadır. Ülkemizde ise 0-14 yaş grubunda ölüme yol açan sebepler arasında zehirlenmeler, % 0,2 oran ile 20. sırada bulunmaktadır. Sağlık Bakanlığı Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Zehir Araştırma Müdürlüğü kayıtlarına göre bütün zehirlenme vakaları arasında pestisitlerin üçüncü sırada yer aldığı görülmektedir. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç ve Zehir Danışma Merkezi 1993-2001 tarihleri arasındaki kayıtlarına göre ise; tarım ilaçları ile zehirlenme %8 ile ikinci sırada yer almaktadır (Tomruk ve ark. 2009). Özellikle organofosforlu insektisitler kaynaklı zehirlenmelerde parasempatomimetik belirtiler, çizgili kas belirtileri ve merkezi sinir sistem belirtileri ortaya çıkar. Akut zehirlenmede 5 dakika ile 24 saat arasında taşikardi, bradikardi, aritmiler, ileti anormallikleri, solunum felci ve ölüm görülür (Koçak ve ark. 2005). Acil servise gelen hastalardan öncelikle çok iyi anamnez alınması gerekir. Eğer zehirlenen çocuk veya bilinci kapalı hasta ise yakınlarından ayrıntılı bilgi alınmaya çalışılmalıdır. Bu maddenin ne zaman hangi yolla alındığı, alınma miktarı, içeriğin ve türün ne olduğu, hastanın önceden başka bir hastalığının olup olmadığı, devamlı kullandığı ilaçların olup olmadığı, daha öncede zehirlenip zehirlenmediği, zehirlendi ise sebebini (intihar amaçlı veya kaza), gelen hasta ile birlikte zehirlenen başka kişi olup olmadığı, madde bağımlısı veya psikiyatrik öyküsünün olup olmadığı ile ilgili sorular sorulmalıdır (Gürpınar ve Aşıröz 2006; Keskin ve ark. 2001).

Yapılan çalışma; 2015-2017 yılları arasındaki Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim Araştırma Hastanesi Acil Servisine zehirlenme ön tanısı ile başvuran hastaların zehirlenme tipi, nedeni, yaş, cinsiyet ve diğer demografik özelliklerini belirleme amaçlandı.

## MATERYAL ve METOT

Bu çalışma, 2015-2017 tarihleri arasındaki Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim Araştırma Hastanesi Acil Servisine zehirlenme tanısı ile başvuran 1027 olguya ait, acil servis hasta muayene kartlarının

incelenmesi ile elde edilen demografik bilgilerden yararlanılarak gerçekleştirildi. Zehirlenme tanısı almış olan tüm hastalar, aşağıda belirtilen çeşitli demografik özelliklerine göre retrospektif olarak incelendi.

1. Yaş.
2. Cinsiyet.
3. Başvurdukları ay.
4. Başvurdukları mevsim.
5. Başvurdukları saat.
6. Orjin, kaza, intihar.
7. Yerleşim yerleri, il, ilçe, köy.
8. Hastanın hangi tür zehir ile zehirlendiği, mantar, CO, insektisit, ilaç, kimyasallar, alkol, korozif maddeler.
9. Hastanın hangi tür ilaçlarla zehirlendiği, analjezik, antibiyotik, antidepresan, antipsikotikler, anksiyolitik, antiepileptikler, antihipertansifler, antiastmatikler, vitaminler, gastrointestinal ilaçlar, hormonal ilaçlar, isim belirtilmemiş ilaçlar, birden fazla çeşit ilaç ve diğerleri olarak gruplandırıldı.
10. Hastaya hangi tedavilerin uygulandığı, gastrik lavaj, gastrik lavajla birlikte aktif kömür uygulanması, aktif kömür, oksijen tedavisi, medikal tedavi.
11. Antidot kullanılması veya kullanılmaması.
12. Hastanın prognozu, ayaktan taburcu, serviste yatış, yoğun bakımda yatış, başka hastaneye sevk, acil serviste ölüm.

Elde edilen değişkenlerin analizinde frekans ve yüzde analizi kullanılmıştır. Buna ek olarak kategorik değişkenlerin birbiri ile ilişkilerinin incelenmesinde ki-kare analizinden yararlanılmıştır. Yapılan bu analizler SPSS 22.0 (SPSS Software, IBM, ABD) programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar literatürle uyumlu şekilde yorumlanmıştır.

## BULGULAR

Yapılan çalışmanın evrenini; Uşak Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Acil Servisine 15.11.2015-15.11.2017 tarihleri arasında başvuru yapan toplam 535911 hasta arasında zehirlenme tanısı ile başvuran 1027 kişi oluşturmaktadır. Bu 1027 hastanın 583'ü (%56,8) kadın, 444'ü (%43,2) erkek olduğu tespit edilmiştir.

İlaç zehirlenmelerinin yaş gruplarına göre dağılımının gösterildiği Tablo 1'e göre, en fazla zehirlenme 21-30 yaş aralığında görülmektedir. Bu yaş aralığındaki bireyler genellikle yeni evlenmiş ya da evlenme çağında bulunmalarından dolayı ailevi sorunların yaşanması, yeni mezun olup iş bulmada zorlukların yaşanması bu yaş aralığında daha fazla intihara bağlı zehirlenmeye neden olduğu söylenebilir.



**Tablo 1. Yaş Gruplarına Göre Olgu Sayıları**  
**Table 1. Number of Cases by Age Groups**

Yaş Grupları	Olgu Sayısı	Yüzde (%)
0-10	10	1,0
11-20	276	26,9
21-30	278	27,1
31-40	205	20,0
41-50	126	12,3
>50	132	12,9
<b>Toplam</b>	<b>1027</b>	<b>100</b>

Zehirlenme olguları nedeniyle başvurunun, en çok mayıs (%10,9) ve nisan (%9,4) ayında olduğu, eylül (%5,9) ayında ise azalış olduğu görülmüştür. Zehirlenme olguları mevsimlere göre incelendiğinde ise en çok ilkbahar (%28,8), en az sonbahar (%21,5) mevsiminde olduğu görülmüştür. Yerleşim yerine göre olgu sayıları incelendiğinde zehirlenme belirtisi ile acil servise başvuran en çok

hasta 673 (%65,5) ile il merkezinden, 149 hasta ilçeden ve 205 hasta ise köyden olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda acil servise başvuru saatlerine göre olgu sayıları incelendiğinde ise en çok başvuru, tüm başvuruların %36,4 oranı ile saat 19.00-24.00 saatleri arasında yapılmıştır. En az başvuru ise 07.00-12.00 saatleri arasındadır (Tablo 2).

**Tablo 2. Acil Servise Başvuru Saatlerine Göre Olgu Sayıları**  
**Table 2. Number of Cases According to Hours of Emergency Department Admission**

Başvuru Saatleri	Olgu Sayısı	Yüzde (%)
1-6	250	24,3
7-12	156	15,2
13-18	247	24,1
19-24	374	36,4
Total	1027	100

Çalışmamızda, yaş ve zehirlenme türüne göre yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Buna göre ilaç zehirlenmesi ile en çok 11-20 ve 21-30 yaş aralığındaki hastalar

hastanenin acil servisine başvurmuştur. Yaş gruplarına göre zehirlenme etkenleri incelendiğinde ilaç ile zehirlenme %58,4 ile ilk sırayı oluşturmaktadır (Tablo 3).

**Tablo 3. Yaş Gruplarına Göre Zehirlenme Etkenleri**  
**Table 3. Poisoning Factors by Age Groups**

Olgu Grupları	Yaş Grupları													
	0-10		11-20		21-30		31-40		41-50		50		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Mantar	0	0	11	4	21	7,6	20	9,8	22	17,5	32	24,2	106	10,3
CO	5	50	24	8,7	22	7,9	35	17,1	15	11,9	29	22	130	12,7
İnsektisit	0	0	1	4	0	0	1	0,5	1	0,8	5	3,8	8	0,8
İlaç	1	10	205	74,3	184	66,2	119	58	61	48,4	30	22,7	600	58,4
Kimyasallar	4	40	27	9,8	30	10,8	17	8,3	20	15,9	27	20,5	125	12,2
Alkol	0	0	6	2,2	9	3,2	6	2,9	4	3,2	7	5,3	32	3,1
Korozif	0	0	2	0,7	12	4,3	7	3,4	3	2,4	2	1,5	26	2,5
<b>Toplam</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>276</b>	<b>100</b>	<b>278</b>	<b>100</b>	<b>205</b>	<b>100</b>	<b>126</b>	<b>100</b>	<b>132</b>	<b>100</b>	<b>1027</b>	<b>100</b>
$\chi^2 = 175,809$														
$p = 0,001$														

Zehirlenmelerde kullanılan ilaç türleri incelendiğinde; en çok %15 oranı ile birden fazla ilaç türü ile zehirlenmeler ve %13,3 ile analjeziklerle zehirlenmeler

belirlenirken, Hastaların %51,3'ünün ise hangi ilaçla zehirlendiği bilinmemektedir (Tablo 4).

**Tablo 4.** Zehirlenmelerde Kullanılan İlaç Türleri  
**Table 4.** Types of Drugs Used in Poisoning

Kullanılan İlaç Türü	Kişi Sayısı	Yüzde (%)
Analjezik	80	13,3
Antidepresan	20	3,3
Antibiyotik	11	1,8
Anksiyolitik	12	2,0
Antiaastmatik	1	0,2
Antiepileptik	9	1,5
Antipsikotik	13	2,2
Antihipertansif	5	0,8
Antispazmodik	7	1,2
Hormon	6	1,0
Belirtilmemiş	308	51,3
Birden Fazla İlaç	90	15,0
Diğerleri	29	4,8
Gastrointestinal	6	1,0
Vitamin	3	0,5
<b>Toplam</b>	<b>600</b>	<b>100</b>

Zehirlenme olguları orjinlerine göre incelendiğinde acil servise başvuran hastaların 411 (%40)'i kaza, 616 (%60)'sı intihar nedeniyle gelmişlerdir. Yaş grupları ve

orjinlerine göre yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). İntihar olgularına bakıldığında tüm intiharların %33,6'sı oranında en fazla 11-20 yaş aralığı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5).

**Tablo 5.** Yaş Gruplarına Göre Orjin Dağılımları  
**Table 5.** Origin Distribution by Age Groups

Olgu Grupları	Yaş Grupları													
	0-10		11-20		21-30		31-40		41-50		50		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<b>Kaza</b>	10	100	69	25	90	32,4	83	40,5	61	48,4	98	74,2	411	40
<b>İntihar</b>	0	0	207	75	188	67,6	122	59,5	65	51,6	34	25,8	616	60
$\chi^2 = 115,818$														
$p = 0,001$														

Cinsiyetler ve orjinlerine göre yapılan karşılaştırmada ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur

( $p < 0,05$ ). Buna göre kadınlarda zehirlenme oranı ve intihar etme oranı daha yüksek bulunmuştur (Tablo 6).

**Tablo 6.** Cinsiyete Göre Orjin Dağılımı  
**Table 6.** Origin Distribution by Gender

Cinsiyet	Orjin		Toplam
	Kaza	İntihar	
Kadın	202	381	583
Erkek	209	235	444
Toplam	411	616	1027
$\chi^2$	16,207		
p	0,001		

Orjin ve zehirlenme etkenlerine göre yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Buna göre, mantar ve

karbonmonoksit zehirlenmelerinin hepsi kaza ile olmuştur. İlaç zehirlenmelerinin 584'ü (%97,33) intihar nedeniyle olmaktadır (Tablo 7).

**Tablo 7.** Orjinlerine Göre Zehirlenme Etkenlerinin Dağılımı  
**Table 7.** Distribution of Poisoning Agents by Origin

Orjin	Zehirlenme Etkeni							
	Mantar	CO	İnsektisit	İlaç	Kimyasallar	Alkol	Korozif	Toplam
Kaza	106	130	6	16	106	28	19	411
İntihar	0	0	2	584	19	4	7	616
Toplam	106	130	8	600	125	32	26	1027
$\chi^2$	852,859							
p	0,001							

Antidot kullanımı ve zehirlenme etkenlerine göre yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Zehirlenme ile acil

servise başvuran 1027 hastadan 133'ünde antidot kullanılmış, 894'ünde antidot kullanılmamıştır (Tablo 8).

**Tablo 8.** Antidot Kullanımı ve Zehirlenme Etkeninin Karşılaştırılması  
**Table 8.** Comparison of Antidote Use and Poisoning Agent

Orjin	Zehirlenme Etkeni							
	Mantar	CO	İnsektisit	İlaç	Kimyasallar	Alkol	Korozif	Toplam
Antidot kullanıldı	10	95	3	11	5	8	1	133
Antidot kullanılmadı	96	35	5	589	120	24	25	894
Toplam	106	130	8	600	125	32	26	1027
$\chi^2$	503,029							
p	0,001							

Zehirlenme ile acil servise başvuran 1027 hasta incelendiğinde 699'u ayaktan taburcu, 167'si servise yatmış, 146'sı yoğun bakıma yatmış, 13'ü başka

hastaneye sevk olmuş, 2'si acil serviste hayatını kaybetmiştir (Tablo 9).

**Tablo 9.** Zehirlenme İle Acil Servise Başvuran Hastaların Prognozları  
**Table 9.** Prognosis of Patients Presenting to the Emergency Department with Poisoning

Prognoz Türü	Olgu Sayısı	Yüzde
Ayaktan	699	68,1
Servise Yatış	167	16,3
Yoğun Bakımda Yatış	146	14,2
Başka Yere Sevk	13	1,3
Acil Serviste Ölüm	2	0,2
<b>Toplam</b>	<b>1027</b>	<b>100</b>

Acil servise zehirlenme tanısı ile başvuran hastaların, %40,9 'una medikal tedavi uygulanmıştır. (Tablo 10).

**Tablo 10.** Zehirlenen Hastaya Uygulanan Tedaviler  
**Table 10.** Treatments For Poisoned Patients

Tedavi	Olgu Sayısı	Yüzde
Gastrik Lavaj	187	18,2
Gastrik Lavaj+Aktif kömür	174	16,9
Aktif Kömür	46	4,5
Oksijen	200	19,5
Medikal Tedavi	420	40,9
<b>Toplam</b>	<b>1027</b>	<b>100</b>

Olgu grupları ve hastanede yatış sürelerine göre yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Buna göre insektisitlerle zehirlenen hastaların büyük kısmı hastanede yatış gerçekleştirmiştir. Zehirlenme nedeni ile acil servise başvuran hastalar hastanede yatış sürelerine göre

incelendiğinde alkol zehirlenmelerinin %100'ü, hastanede yatmayıp acil servisten taburcu olmuştur. İlaç zehirlenmesiyle başvurup hastanede yatan 243 hastadan 115'i 2-4 gün arası hastanede yatmıştır (Tablo 11).

**Tablo 11.** Zehirlenme Nedeni ile Başvuran Hastaların Hastanede Yatış Süreleri  
**Table 11.** Hospitalization Periods of Patients Admitted with Poisoning

Olgu Grupları	Hastanede Yatış Süresi									
	Yatmadı		1 gün		2-4 gün		5 gün ve daha fazla		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Mantar	69	65,1	14	13,2	20	18,9	3	2,8	106	100
CO	125	96,2	2	1,5	2	1,5	1	0,8	130	100
İnsektisit	1	12,5	2	25	4	50	1	12,5	8	100
İlaç	357	59,5	98	16,3	115	19,2	30	5	600	100
Kimyasallar	105	84	3	2,4	15	12	2	1,6	125	100
Alkol	32	100	0	0	0	0	0	0	32	100
Korozif	25	96,2	0	0	0	0	1	3,8	26	100
<b>Toplam</b>	714	69,5	119	11,6	156	15,2	38	3,7	1027	100
$\chi^2 = 126,464$										
$p = 0,001$										

## TARTIŞMA

Teknolojinin hızla ilerlemesi ve endüstrileşme ile birlikte çok sayıda ilaç ve kimyasal madde yaşamımıza girmiştir. Bunların yanlış ve kötü amaçla kullanılmasıyla ortaya çıkan zehirlenmelerin, tedavi gerektiren acil durumlar önem kazanmıştır (Yılmaz ve ark. 2006).

Tüm acil servislere zehirlenme vakaları, acil tıbbın bütününde önemli bir bölümünü oluşturan hayati önem arz eden ve acil müdahale gerektiren olgulardır. Amerika kıtasında zehirlenme sikayeti ile hastaneye başvuru oranı yılda 3 milyon civarında iken Türkiye'de Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü Ulusal

Zehir Merkezi'ne başvuranların oranı ise yılda 14400 kişi olduğu bildirilmiştir (Zeren ve ark. 2012).

Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim Araştırma Hastanesi Acil Servisine başvuran, takip ve tedavisi yapılan zehirlenme olguları ile ilgili sonuçları değerlendirmek ve durum tespiti etmek amacı ile yapılan bu çalışmada; 2015-2017 yılları arasında 2 yıllık sürede acil servis polikliniğine toplam 535911 hasta başvurmuş ve bunlardan 1027 (%0,19) hastaya zehirlenme tanısı konmuştur. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda bu oranlar değişiklik göstermektedir. Kırıkkale'deki yapılan bir çalışmada bu oran %1,78

(Deniz ve ark. 2009), Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı'nda yapılan çalışmada %1,70 (Çetin ve ark. 2004), Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yapılan bir çalışmada %0,85 (Katı ve ark. 2004) ve Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi'ndeki çalışmalarda ise %0,38 oranında bulunmuştur (Ayan ve ark. 2012). Yeni Zelanda'da 1996 yılında yapılan bir çalışmada ise bu oran %1,10 olarak bulunmuştur (Weir ve Ardagh 1998).

Çalışmamızda acil servise zehirlenme tanısıyla başvuran hastaların kadın erkek oranı 1,33/1 dir. Yapılan araştırmalarda bu oran 0,62/1 ile 2,54/1 arasında değişmektedir. Keleş ve ark. (2003) Ankara'da yaptığı bir çalışmada bu oranı 2,54/1, Zeren ve ark. (2012) ise Mustafa Kemal Üniversitesi Hastanesi Acil Servisi'nde yaptığı çalışmada 2,26/1, Vapur (2010) Edirne İli Devlet Hastaneleri Acil Servisi'ne başvuran zehirlenme olgularını incelediği çalışmada bu oran 1,14/1, Tountas ve ark. (2001) bu oranı 1,92/1, Nepalde Singh ve Acharya (2006) 1,30/1, Güney Hindistan'ın Karnataka Bölgesinde 2003 yılındaki çalışmada 0,62/1 (Jaiprakash ve ark. 2011) ve 2004-2009 yılları arasında Çin'de yapılan bir çalışmada 1,04/1 oranında bulunmuştur (Chen ve ark. 2010).

Zehirlenme vakalarını yaş gruplarına göre oldukça değiştiği belirlendi. Çalışmamızda en çok zehirlenme vakası sırasıyla 21-30 (%27,1), 11-20 (%26,90), 31-40 (%19,96), 50 (%12,85), 41-50 (%12,26) ve 0-10 (%0,97) yaşları arasında görüldüğü tespit edildi. Daha önceden yapılan araştırmalarda benzer yaş gruplarında zehirlenme vakaların daha sık görüldüğü ifade edilmiştir. Erdoğan ve ark. (2013) 'nın Zile'de yaptığı çalışmada en çok 11-25 yaş aralığında %58,4, Ayan ve ark. (2012) 'nın Gaziosmanpaşa'da yaptığı çalışmada en çok 16-25 yaş aralığında %48,9, Kaya ve ark. (2006)'nın Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yaptığı çalışmada 15-20 yaş aralığında %52,7, 21-30 yaş aralığında ise %32,7 oranında belirlenmiştir. Srivastava ve ark. (2005)'nin New Delhi'de yaptığı çalışmada en yüksek 14-40 yaş, Bari ve ark. (2014)'ları Bangladeş'te en çok zehirlenen grubu 21-30 yaş (%41,6), Jaikhani ve ark. (2014)'nın 21-30 yaş arasında %38,8 ve Kumar ve ark. (2010)'nın Güney Hindistan'da 21-30 yaş grubunda %40 oranında zehirlenme olduğu bildirilmiştir. Özellikle bu yaş grubunda intiharların fazla görülmesinin nedeni ekonomik, ailesel, duygusal ve duyu durum bozulduğundan olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda zehirlenmeler etkenlerine göre karşılaştırıldığında %58,4 zehirlenme oranı ile ilaçlar birinci sırada gelmektedir. Sonra sırasıyla; CO zehirlenmeleri (%12), kimyasallar (%12,2), mantar (%10,3), alkol (%3,1), korozif maddeler (%2,5) ve insektisitlerle (%0,8) zehirlenmeler takip etmektedir. Zehirlenme nedenlerinden yüksek oranda olan ilaçlarla zehirlenmede; %15'lik bir zehirlenme oranında birden fazla ilaç kullanarak zehirlenmeler olduğu görülmüştür. Yeşil ve ark. (2008)'ları Marmara Tıp Fakültesi Acil Servisi'nde yaptıkları çalışmada zehirlenme nedeni

olarak sırasıyla ilaç (%49), besin (%42,8) ve alkol (%8,2) ile zehirlenme olduğu belirtilmiştir. Yılmaz ve ark. (2013)'nin Sivas Numune Hastanesi Acil Servisi'nde yaptığı çalışmada; 1894 kayıta sırasıyla; ilaç (%36,9), karbonmonoksit (%16,6), arı sokması (%16,6), korozif madde (%14,1), alkol (%9,3), besin (%3,4), akrep sokması (%1,3), böcek sokması (%0,4), organofosfat (%0,4), uyuşturucu (%0,3), yılan sokması (%0,3), boya (%0,2), fare zehiri (%0,1) ve tiner (%0,1) ile zehirlenme nedeniyle acil servise başvurduğu görülmüştür. Ayan ve ark. (2012) 'nın Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Acil Servisi'nde yaptıkları çalışmada, en fazla ilaçlardan (%47), daha sonra sırasıyla; karbonmonoksit (%22,2), tarım ilacı ve besin (%8,3), korozif madde (%6,1), mantar ve alkol (%3,9) den zehirlendikleri tespit etmişlerdir. Kadiroğlu ve ark. (2013), Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi yoğun bakım ünitesinde akut ilaç zehirlenmesiyle yatırılan hastalarda yaptıkları çalışmada ilaç zehirlenmelerinin (%51,2) daha fazla olduğu görülmüştür. Singh ve Acharya (2006)'nın, Nepal'de 2005 yılında bir hastane acil servisinde yaptıkları çalışmada, zehirlenme nedenleri olarak insektisitler (%63), rodentisitler (%11), analjezikler (%7) ve anksiyolitikler (%5) olduğunu bildirmiştir.

Günümüzde özellikle gençlerde rastladığımız intiharlar, gelişmiş ve gelişmekte olan birçok ülkede trafik kazalarından sonra ilk sıralarda gelen ölüm nedenlerinden birisi haline gelmiştir. Bu durum, önemli bir halk ve ruh sağlığı sorunu ile de baş başa kaldığına göstergesidir. Çalışmamıza göre en çok intihar (%59,9) ve kaza (%40) ile zehirlenme belirlenmiştir. İntihar en çok ilaçla olan zehirlenmelerde görülmüştür (%97,3). Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ndeki 2008-2011 tarihleri arasındaki zehirlenme vakaları incelemelerinde, olguların %87'sinin intihar olduğunu, bunlarında %70,2'sinin birden fazla ilaç alımı, %29,8'inin tek ilaç alımlarından kaynaklandığını tespit edilmiştir (Özayar ve ark. 2011). Başka bir çalışmada; 0-10 yaşındaki çocukların zehirlenme nedenlerinin tamamı yanlışlıkla ilaç alımından, 11 yaş ve üzeri erişkinlerin %81,2 (128 vakanın 104'ü) oranında intihar nedeniyle zehirlendiklerini tespit edilmiştir (Zeren ve ark. 2012). Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'ndeki çalışmada %82'si intihar amacıyla, %11,3'ü yanlışlıkla ilaç veya madde alımı nedeniyle zehirlendiklerini belirlemişlerdir (Kıyan ve ark. 2009). Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Acil Polikliniği'nde 323 hastanın %13,9'nun intihar amacıyla %85,8'inin, ise kaza sonucu zehirlendikleri belirlenmiştir (Öntürk ve Uçar 2003). New Delhi'de yaptığı üç yıllık çalışmada zehirlenmelerin %53'ünün intihar, %47'sinin kaza ile olduğu görülmüştür (Srivastava ve ark. 2005). Nepal'de 2005 yılında bir hastane acil servisinde yaptıkları 6 aylık bir çalışmada zehirlenmelerin %98'i intihar, %2'si kazara olmuştur (Singh ve Acharya 2006). Hindistan'da zehirlenmelerin %69,9'u intihar (Jaikhani ve ark. 2014) ve Güney Hindistan'ın Karnataka Bölgesi'nde

zehirlenmelerin %94'ü intihar, %6'sı kaza olduğu belirlenmiştir (Jaiprakash ve ark. 2011).

Çalışmamızda acil servise zehirlenme nedeni ile başvuran 1027 hasta prognozlarına göre incelendiğinde %68,1'i ayaktan taburcu olmuş, %16,3'ü servise yatırılmış, %14,2'si yoğun bakımda yatmış, %1,3'ü başka bir hastaneye sevk olmuş ve %0,2'sinde acil serviste ölüm görülmüştür. Acil serviste uygulanan tedaviler incelendiğinde %40,9'unda medikal tedavi, %18,2'sinde gastrik lavaj, %16,9'unda gastrik lavaj ve aktif kömür birlikte uygulanmış, %4,5'inde sadece aktif kömür ve %19,5'ine oksijen tedavisi uygulanmıştır. Mustafa Kemal Üniversitesi Hastanesi Acil Servisi'nde 134 zehirlenme vakalarında, 21 hastanın (%15,6) yoğun bakıma alındığı, 75 hastanın (%56) acil serviste yatırılarak tedavi edildiği ve 38 hastanın (%28,4) ise acil serviste 4-6 saatlik takip ve tedavi ile taburcu edildiği bildirilmiştir. Tedavide, hastaların 123 (%91,8) ünün midelerinin yıkanması, antidot ve aktif kömür uygulaması yapılmış, 5 hastaya (%3,7) ise mide yıkaması ve aktif kömür uygulaması yapılmıştır (Zeren ve ark. 2012). Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Servisi'nde yapılan çalışmada çalışmada, 100 zehirlenme olgusundan 87'si yoğun bakımda yatmış, 13 hasta ise acil serviste takip ve tedavi edilerek taburcu edilmiştir (Çetin ve ark. 2004). Ankara'da çocuk acil servisine zehirlenme olgusu ile gelen 255 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, hastaların %48,6'sına oksijen inhalasyonu, %25,1'ine aktif karbon ve gastrik lavaj verilmesi, %19,2'sine hidrasyon ve %3,5'ine de antidot uygulaması yapıldığını bildirmiştir (Kendirici ve ark. 2011). Çin'de 2004-2009 yılları arasında yapılan bir çalışmada acil tedavi sonrası hastaların %69,54'ü takip edilmiş, %30,39'u hastaneye yatırılmış, %0,14 oranında ölüm görülmüştür (Chen ve ark. 2010).

## SONUÇ

Bu çalışmada, 15.11.2015-15.11.2017 tarihleri arasındaki 2 yıl içinde Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim Araştırma Hastanesi Acil Servisine zehirlenme tanısı ile başvuran 1027 olgu değerlendirilmiştir. Hastaların demografik özellikleri değerlendirilerek ulaşılan bulgularla literatürler karşılaştırılmıştır. Bu retrospektif çalışma ile Türkiye genelindeki zehirlenme olguları ile bizim 2 yıllık zehirlenme hasta grubumuzun büyük oranda uyumluluk gösterdiğine ulaşılmıştır.

Çalışmamızda zehirlenmeler etkenlerine göre karşılaştırıldığında birinci sırada 600 olgu ve %58,4 zehirlenme oranı ile ilaçlar yer almaktadır. Yaş ve cinsiyet dağılımına bakıldığında karşılaşılan vakalarda büyük kısmın genç ve bayan populasyon olduğu görüldü. Zehirlenmeler en çok ilkbahar mevsiminde ve acil servise başvuruların en çok 19.00-24.00 saatleri arasında yapıldığı görüldü.

Çoklu ilaç zehirlenmelerinin fazla olmasının nedeni, hasta yakınlarının genellikle hastanın aldığı ilaç sayısını ve çeşidini tam olarak bilememesi veya daha fazla olarak ifade etmesinden kaynaklanabileceği

düşünülmektedir. Ayrıca hastaların dikkat çekmek amacıyla atmadığı halde ilaçları kullanmış olabilir. Zehirlenme olguları incelendiğinde %40'ı kaza, %60'ı intihar nedeniyle olduğu belirlenmiştir.

Tüm intihar olgularının %61,9'u kadın ve %38,1'in ise erkek olduğu ve intihar en çok 11-20 yaş aralığında görüldü. İntihar oranının en çok kadın ve genç kişilerde görülmesinin nedeninin toplumsal düzenin kadınlar üzerinde daha çok baskı kurması, genç popülasyonda ekonomik sorunlar, işsizlik, depresyon, sınav stresi, aile içi şiddete maruz kalma gibi nedenlerle baş edememenin bu yaşlardaki insanları intihar amaçlı zehirlenme girişimlerine yönelttiği düşünülebilir.

Acil servise başvuran hastaların tedavilerine bakıldığında çoğuna medikal tedavi uygulanmış olup, gastrik lavaj ve aktif kömür uygulamaları da sık kullanılmıştır. Zehirlenme çeşidine göre antidot ve oksijen tedavileri de kullanılmıştır.

Sonuç olarak kazara veya intihar amaçlı madde alımı ile acil servise gelen hastalar oldukça sık karşılaşmakta olan bir hasta grubunu oluşturmaktadır. Kazara olan zehirlenmelerle özellikle çocuklarda ve 50 yaş üzerinde sık karşılaşmaktadır. Kazara zehirlenmelerle ilgili ailelerin bilgilendirilip bu tür zehirlenmelere karşı çocuklarını eğitmeleri sağlanıp zehirlenme oranı azaltılmalıdır. Yaşlılarda kazara zehirlenmelere neden olan etkenlere karşı önlemler alınmalıdır. İntihar amaçlı zehirlenmelerin çok görüldüğü yaş aralığı sosyoekonomik ve sosyokültürel açıdan değerlendirilmeli, bunların azaltılması için neler yapılabileceğine bakılmalıdır. Hastaların ilaçlara nasıl ulaştıklarıyla ilgili çalışmalar yapılmalıdır. Özellikle ilaçla zehirlenmelerde sık kullanıldığı görülen antibiyotikler, analjezikler, antidepresanlar gibi ilaçların reçetesiz satılmaması ve bunlarla ilgili denetimlerin düzenli olarak yapılması gerekmektedir.

**Çıkar çatışması:** Bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederiz.

**Yazarların Katkı Oranı:** Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamışlardır.

**Etik izin:** Bu çalışma "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 8 (k) gereği HADYEK iznine tabi değildir. "AKÜ Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma Yayın Etik Kurulu" nun 2018/05 karar no'su ile çalışma onayı alınmıştır.

**Teşekkür:** Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından çalışmamıza 18.SAĞ.BİL.31 proje numarası ile desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

**Açıklama:** Bu makale birinci yazarın, ikinci yazar danışmanlığında hazırladığı yüksek lisans tezinden üretilmiştir. Bu çalışma 1. Uluslararası Farmakoloji ve Toksikoloji kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur (Kayseri, 04-07 Eylül, 2019).

## KAYNAKLAR

- Ayan, M., Başol, N., Karaman, T., Taş, U., & Esen, M. (2012). Zehirlenme İle Acil Servise Gelen Hastaların Retrospektif Değerlendirilmesi, 20 Aylık Çalışma. The Journal Of Academic Emergency Medicine, 11, 146-50.
- Barı, M.S., Chakraborty, S.R., Alam, M.H.J, Qayyum, J.A., Hassan, N., & Chowdhury, F.R. (2014). Four-Year Study On Acute Poisoning Cases Admitted To A Tertiary Hospital In Bangladesh, Emerging Trend Of Poisoning In Commuters. Asia Pacific Journal Of Medical Toxicology, 3, 152-6.
- Baydın, A., Akar, H., Karaca, A., Yardan, T., Bayrak, İ., & Baydın M., (2010). Metanol Zehirlenmesinde Bilateral Putaminal Nekroz Ve Ani Körlük. Yoğun Bakım Dergisi, 9(3), 168-172.
- Chen, F., Wen, J.P., Wang, X.P., Lin, Q.M., & Lin, C.J. (2010). Epidemiology And Characteristics Of Acute Poisoning Treated At An Emergency Center. World Journal Of Emergency Medicine, 1(2), 154-156.
- Çetin, N.G., Beydilli, H., & Tomruk, Ö. (2004). Acil Servise Başvuran İntoksikasyon Olgularının Geriye Dönük Analizi. S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi, 11(4), 7-9.
- Deniz, T., Kandış, H., Saygun, M., Büyükkoçak, Ü., Ülger, H., & Karakuş, A. (2009). Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Servisine Başvuran Zehirlenme Olgularının Analizi. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi, 11(2), 15-20.
- Ecevit, Ç., Hızarcıoğlu, M., Gerçek, P. A., Gerçek, H., Kayserili, E., Gülez, P., & Apa, H. (2004). Acil Servise Başvuran Mantar Zehirlenmelerinin Retrospektif Olarak İncelenmesi. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 5(3), 11 – 14.
- Erdoğan, N.M., Uğuz M., & Kaymak, S. (2013). Zile Devlet Hastanesi Acil Servisine Başvuran İntoksikasyon Hastalarının Değerlendirilmesi. Gazi Medical Journal, 24(4), 113-116.
- Ergüven, M., Çakı, S., & Deveci, M. (2004). Mantar Zehirlenmesi, 28 Vakanın Değerlendirilmesi. Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Dergisi, 47, 249-253.
- Giniş, T., Gürsoy, C., Mısırlıoğlu, E.D., & Kocabaş, C.N. (2014). Sekiz Yıllık Dönemde Karbonmonoksit Zehirlenmelerinin Değerlendirilmesi. Türkiye Çocuk Hastalıkları Dergisi, 2, 55-58.
- Gunnell, D., & Eddleston, M. (2003). Suicide By Intentional Ingestion Of Pesticides, A Continuing Tragedy In Developing Countries. Int J Epidemiol, 32, 902 -909.
- Gürpınar, T., & Aşlırdizer, M. (2006). Zehirlenmelerde Hekim Sorumluluğu. Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci, 2(50), 56-62.
- Güven, M. (2004). Organik Fosfor Zehirlenmeleri. Yoğun Bakım Dergisi, 4(2), 113-121.
- Jainprakash, H., Sarala, N., Venkatarathnamma, P.N., & Kumar, T.N. (2011). Analysis Of Different Types Of
- Jaikhani, S.M.K., Naik, J.D., Thakur, M.S., Langare, S.D., & Pandey, V.O. (2014). Retrospective Analysis Of Poisoning Cases Admitted In A Tertiary Care Hospital. International Journal Of Recent Trends In Science And Technology, 10(2), 365-368.
- Kadiroğlu, A.K., Yılmaz, Z., Yıldırım, Y., Ebik, B., Yıldırım, S., Oto, F., Ulucan, F., Karakuş, A., Genç, D., & Yılmaz, M.E. (2013). Güneydoğu Anadolu Bölgesindeki Bir Üniversite Hastanesinde Akut İlaç Zehirlenmesi Olan Hastaların Özellikleri Ve Klinik Sonuçlarının Değerlendirilmesi. Düzce Tıp Dergisi, 15(2), 38-40.
- Kandış, H., Katurcı, Y., & Karapolat, B. (2009). Karbonmonoksit Zehirlenmesi. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 11(3), 54-60.
- Karaman, K., Avcil, M., Kantekin, B., Özlüer, Y. E., Yaşar, H. E., Avcil, S., & Kapıcı, M. (2016). Acil Servise Kabul Edilen Parasetamol İntoksikasyon Olgularının Geriye Dönük İncelenmesi. Meandros Medical Journal, 17, 11-6.
- Katı, İ., Silay, E., Tekin, M., Tomak, Y., & Dilek, İ. (2004). Reanimasyon Ünitemizdeki Erişkin Zehirlenme Olgularının İncelenmesi. Van Tıp Dergisi, 11(3), 81-84.
- Kaya, S., Karanmaz, A., Karaman, H., & Turhanoglu, S. (2006). Yoğun Bakımımızdaki Zehirlenme Olgularının Geriye Dönük Analizi. Dicle Tıp Dergisi, 33(4), 242-244.
- Keleş, A., Demircan, A., Aygencel, G., Karamercan, A., & Turanlı, S. (2003). Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Servise Başvuran Zehirlenme Olgularının Geriye Dönük Analizi. Akademik Acil Tıp Dergisi, 1, 39-42.
- Kendirci, H.N.P., Çolakoğlu, E.Y., Hızlı, Ş., Koçak, M., Saylam, E., Polat, E., & Yılmaz, G. (2011). Hastanemiz Çocuk Acil Servisine Başvuran Zehirlenme Olgularının Değerlendirilmesi. Türkiye Çocuk Hast. Derg. 5(1), 29-35.
- Keskin, R., Yorulmaz, C., Yavuz, M.S., & Aşlırdizer, M. (2001). Zehirlenme Olgularında Hayati Tehlike Kararı İçin Glasgow Koma Skalasının Kullanımı. Adli Tıp Bülteni, 6(1), 8-13.
- Kıyan, S., Özseraç, M., Ersel, M., Yürüktümen, A., Karahallı, E., Özçete, E., & Çevrim, Ö. (2009). Akut Zehirlenme Hastalarının İki Yıllık Değerlendirilmesi. Türkiye Acil Tıp Dergisi, 9(1), 24-30.
- Koçak, A., Şenol, E., Kök, H. O., & Aktaş, E.Ö. (2005). Organofosfat (Tamaron) Zehirlenmesi Sonrasında Gelisen Nöropati. Türkiye Klinikleri J Foren Med, 2(3), 109-111.
- Kol, İ. Ö., Düger, C., & Gönüllü, M. (2004). Yoğun Bakımda Tedavi Edilen Mantar İntoksikasyonu Olgularının Değerlendirilmesi. C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi, 26(3), 119-122.
- Koylu, R., Dundar, Z.D., Koylu, O., Akıncı, E., Akilli, N.B., Gonen, M.O., & Cander, B. (2014). The Experiences In A Toxicology Unit, A Review Of 623 Cases. J Clin Med Res, 6(1), 59-65.



- Kumar, S.V., Venkateswarlu, B., Sasikala, M., & Kumar, G.V. (2010).** A Study On Poisoning Cases In A Tertiary Care Hospital. *Journal Of Natural Science, Biology And Medicine*, 1(1), 35-38.
- Öntürk, A.Y., & Uçar, B. (2003).** Eskişehir Bölgesinde Çocukluk Çağ Zehirlenmelerinin Retrospektif Değerlendirilmesi. *Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Dergisi*, 46, 103-113.
- Özayar, E., Değerli, S., Güleç, H., Şahin, Ş., & Dereli, N. (2011).** Yoğun Bakıma Kabul Edilen Zehirlenme Olgularının Retrospektif Analizi. *Yoğun Bakım Dergisi*, 3, 59-62.
- Sawalha, Af., Sweileh, Wm., Tufaha, Mt., & Al-Jabi, Dy. (2010).** Analysis Of The Pattern Of Acute Poisoning In Patients Admitted To A Governmental Hospital In Palestine. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 107, 914-918.
- Singh, DP., & Aacharya, RP. (2006).** Pattern Of Poisoning Cases In Bir Hospital. *Journal Of Institute Of Medicine*, 28(1), 3-6.
- Srivastava, A., Peshin, S.S., Kaleekal, T., & Gupta, S.K. (2005).** An Epidemiological Study Ofpoisoning Cases Reported To The National Poisons Information Centre, All India Institute Of Medical Sciences, New Delhi. *Human&Experimental Toxicology*, 24, 279 – 285.
- Şen, A., & Orak, M. (2015).** Salisilik Asit Zehirlenmeleri. *Derman Tıbbi Yayıncılık*, Sy. 341.
- Tomruk, Ö., Ögüt, S., & Çetin, N. (2009).** Acil Servise Başvuran Pestisit Zehirlenmelerinin Değerlendirilmesi. *Akademik Acil Tıp Dergisi*, 8(4), 34-35.
- Tountas, C., Sotiropoulos, A., Skliros, S.A., Kotsini, V., Peppas, T.A., Tamvakos, E., & Pappas, S. (2001).** Voluntary Self-Poisoning As A Cause Of Admission To A Tertiary Hospital Internal Medicine Clinic In Piraeus, Greece Within A Year. *Bmc Psychiatry*, 1(4), 1-4.
- Tunçok, Y. & Kalyoncu, N.İ. (2007).** T.C Sağlık Bakanlığı Birinci Basamağa Yönelik Zehirlenmeler Tanı Ve Tedavi Rehberleri, Ankara. Sy. 1.
- Vapur, G. (2010).** 2006-2008 Yılları Arasında Edirne İli Devlet Hastanelerinde Acil Servise Başvuran İntoksikasyon Olgularının İncelenmesi, , Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi
- Weir, P., & Ardagh, M. (1998).** The Epidemiology Of Deliberate Self Poisoning Presenting To Christchurch Hospital Emergency Department. *The New Zealand Medical Journal*, 111(1063), 127-29.
- Yeşil, O., Akoğlu, H., Onur, Ö., & Güneysel, Ö. (2008).** Acil Servise Başvuran Zehirlenme Olgularının Geriye Dönük Analizi. *Marmara Medical Journal*, 21(1), 26-32.
- Yılmaz, A., Güven, F.M., Korkmaz, İ., & Karabulut, S. (2006).** Acil Serviste Akut Zehirlenmelerin Retrospektif Analizi. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 28 (1), 21-26.
- Yılmaz, Y., İnal, F.Y., Toptaş, M., Gürelik, B., & Erşan, İ. (2013).** Sivas Numune Hastanesine Başvuran İntoksikasyon Olgularının Geriye Dönük Değerlendirilmesi. *Haseki Tıp Bülteni*, Sy. 178-180.
- Zeren, C., Karakuş, A., Çelik, M.M., Arıca, V., Tutanç, M., & Arslan, M.M. (2012).** Evaluation Of Intoxication Cases Applying To The Emergency Department Of Medical School Hospital. *The Journal Of Academic Emergency Medicine*, 11, 31-4.

## Antibacterial Activity of Neutral Electrolyzed Water Against *Listeria monocytogenes*

Gülay Merve BAYRAKAL<sup>1\*</sup>, Ali AYDIN<sup>1</sup>, Çağla SARIMADEN NASRİ<sup>2</sup>, Gürhan ÇİFTÇİOĞLU<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, İstanbul University-Cerrahpaşa, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Eville and Jones, Lincoln, UK

<sup>3</sup>Inovatif Biotechnology Chemistry and Health Ltd., İstanbul University Technopark Bld., İstanbul, Türkiye

### ABSTRACT

Inadequate cleaning and disinfection processes in the food industry are major causes of foodborne infections. Therefore, an effective cleaning process is essential for food production areas. Traditional disinfectants in the food industry have side effects like corrosion, irritation, toxicity, and residue problems. Therefore, electrolyzed water has become increasingly popular as an effective disinfectant in the food industry. Neutral electrolyzed water (NEW) contains hypochlorous acid and hypochlorite to inactivate pathogens effectively and has been proven to be stable. *Listeria monocytogenes*, a common foodborne pathogen, can be found throughout the food production chain at different points and conditions. This study examined the antimicrobial effect of NEW on *L. monocytogenes* at different concentrations, exposure times, and in vitro conditions. To assess the effectiveness of NEW, 0.1 %, 5 %, 10 %, 50 %, and 90 % concentrations were prepared, and the inactivation treatment was carried out for 30, 60, 90, and 120 min at room temperature. The results showed that at concentrations of 10 %, 50 %, and 90 %, the disinfectant significantly reduced the number of *L. monocytogenes* to undetectable levels within 30 minutes. However, about 1 log<sub>10</sub> reduction was achieved at 0.1 % concentration in all applied times. This study reveals that NEW is highly effective for inactivating *L. monocytogenes* and should be used more in the food industry. In conclusion that NEW is a safe, environmentally friendly, and not harmful to food quality alternative to traditional disinfectants in the food industry, and recommended its increased use.

**Keywords:** Antimicrobial activity, *Listeria monocytogenes*, neutral electrolyzed water

\*\*\*

### Nötral Elektrolize Suyun *Listeria monocytogenes*'e Karşı Antibakteriyel Etkinliği

#### ÖZ

Gıda kaynaklı enfeksiyonların başlıca nedenleri arasında gıda endüstrisindeki yetersiz temizlik ve dezenfeksiyon işlemleri yer almaktadır. Bu nedenle, gıda üreten işyerlerinde yerinde etkin temizlik çok önemlidir. Gıda endüstrisinde kullanılan geleneksel dezenfektanların tahriş meydana getirme, korozyon, toksisite ve kalıntı oluşturma gibi yan etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle elektrolize su, gıda endüstrisinde etkin bir dezenfektan olarak popülerlik kazanmıştır. Nötral elektrolize su (NES), patojenleri etkili bir şekilde inaktive etmek için hipokloröz asit ile hipoklorit içermekte olup, ayrıca NES'in kararlı olduğu da kanıtlanmıştır. Gıda kaynaklı yaygın bir patojen olan *Listeria monocytogenes*, gıda üretim zinciri boyunca farklı noktalarda ve koşullarda bulunmaktadır. Bu çalışmada, NES'in farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde ve in vitro koşullarda *L. monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. NES'in etkinliğini değerlendirmek için %0.1, %5, %10, %50 ve %90'luk konsantrasyonlar hazırlanarak inaktivasyon işlemi oda sıcaklığında 30, 60, 90, 120 dakikalık sürelerde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, dezenfektanın %10, %50 ve %90 konsantrasyonlarının *L. monocytogenes* sayısını 30 dakika içinde tespit edilemeyen seviyelere düşürdüğünü göstermiştir. Buna karşın, %0.1 konsantrasyonda ise tüm uygulanan sürelerde yalnızca 1 log<sub>10</sub> azalma sağlanmıştır. Bu çalışma, NES'in *L. monocytogenes*'i inaktive etmek için oldukça etkili olduğunu ve gıda endüstrisinde daha fazla kullanılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, NES' in gıda endüstrisindeki geleneksel dezenfektanlara karşı güvenli, çevre dostu ve gıda kalitesine zarar vermeyen bir alternatif olduğu saptanmış olup, kullanımının artırılmasını tavsiye edilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antimikrobiyal aktivite, *Listeria monocytogenes*, nötral elektrolize su

To cite this article: Bayrakal G.M. Aydın A. Sarımaden Nasrı Ç. Çiftçiöğlü G. Antibacterial Activity of Neutral Electrolyzed Water Against *Listeria monocytogenes*. Kocatepe Vet J. (2023) 16(4): 574-579

Submission: 25.08.2023 Accepted: 05.12.2023 Published Online: 14.12.2023

ORCID ID: GMB: 0000-0002-2015-7182, AA: 0000-0002-4931-9843, ÇSN: 0009-0008-8202-6947 GC: 0000-0002-5584-517X

\*Corresponding author e-mail: [merve.bayrakal@iuc.edu.tr](mailto:merve.bayrakal@iuc.edu.tr)

## INTRODUCTION

Foodborne illnesses are a major concern in the food industry. One of the main causes of foodborne infections is inadequate cleaning and disinfection in the food industry, thus proper cleaning is essential. Disinfection procedures aim to eliminate pathogens and spoilage microorganisms (Mısırlı and Aydın 2011; Pedreira et al. 2021; Yuan et al. 2021).

Disinfectants used in the food industry (chlorine compounds, organic acids, quaternary ammonium compounds, hydrogen peroxide, peroxides, amphoteric compounds, etc.) can have high costs and side effects such as corrosive defects, irritation, toxicity, and residue problems (Mısırlı and Aydın 2011; Deshmukh et al. 2019; Carrascosa et al. 2021; Yuan et al. 2021).

In recent years, electrolyzed water (EW) has been increasingly used as an effective disinfectant in the food industry (Zhao et al. 2021). EW is produced by the electrolysis of diluted salt solution (tap water and NaCl solution) in an electrolytic cell. The electrolytic cell has two sides (anode and cathode) separated by a diaphragm (Chen and Wang, 2022). Acid-electrolyzed water (AEW) produced at the anode side has low pH and high oxidation-reduction potential (Xuan and Ling 2019; Iram et al. 2021). AEW has a strong bactericidal effect but can be corrosive to processing equipment and irritating to hands (Iram et al. 2021; Jee and Ha 2021). Alkaline electrolyzed water (AIEW), or basic electrolyzed water (BEW) generated on the cathode side, has a high pH value and a low redox potential (Xuan and Ling 2019). It is commonly used as a pre-treating and cleaning agent (Xie et al. 2012).

Neutral electrolyzed water (NEW) can be produced by using several methods. One of them is (1) mixing acidic and basic electrolyzed water and others, (2) using the electrolytic system with no separation membrane, and (3) redirecting the AEW to the cathode side (Ding and Liao 2019; Xuan and Ling 2019; Iram et al. 2021).

The pH of NEW is neutral and contains two important components to inactivate pathogens: hypochlorous acid (HOCl), the most effective chlorine compound, and hypochlorite (ClO). (Cui et al. 2009; Shiroodi et al. 2021). NEW is more stable than other electrolyzed water solutions because of reduced chlorine loss (Deza et al. 2005). Compared with other traditional agents, it has some advantages: strong bactericidal and antimicrobial effects, harmless to humans and the environment, low cost, easy to use, non-corrosive, and non-irritating structure (Chen and Wang 2022).

Many studies have shown the effectiveness of NEW against various foodborne pathogens and other microbiological contaminants on food contact surfaces (Al-Qadiri et al. 2019; Possas et al. 2021; Jee and Ha 2023) and foods (Medina-Gudiño et al. 2020;

Sheng et al. 2020; Torres-Rosales et al. 2020; Hamidi et al. 2021).

*Listeria monocytogenes* can be found at different contact surfaces and conditions in the food production chain (Coban et al. 2019; Kara and Aslan 2021). It leads to major foodborne outbreaks and listeriosis with high mortality rates (20-30 %) (Martínez-Suárez et al. 2016; Şahin and Ayyıldız 2020). Listeriosis leads to severe sepsis, meningitis, meningoencephalitis, abortions, stillbirth, and death (Pogreba-Brown et al., 2022).

Since *L. monocytogenes* is considered one of the most important foodborne pathogens in the food industry, this current study aimed to investigate the in vitro effect of different concentrations of NEW at different periods on the viability of *L. monocytogenes*.

## MATERIALS and METHODS

### Bacterial strains and preparation of inoculum

NEW was obtained from commercial EW systems (Danish Clean Water, T-20 Series, Denmark). pH values and free active chlorine values of NEW were 8.5 and 499.42 mg.l<sup>-1</sup>, respectively. Concentrations of 0.1 %, 5 %, 10 %, 50 %, and 90 % of NEW were prepared using sterile deionized water immediately prior to challenge testing to demonstrate the minimum effective dose for *L. monocytogenes*. Sterile tap water was used as a control.

*L. monocytogenes* ATCC 19115 reference strain was used in this study's inactivation test (assay). *L. monocytogenes* was cultured on Tryptic Soy Agar (TSA; Oxoid, CM0131, Basingstoke, UK) plates at 37 °C for 24 h. After incubation, the bacterial cultures were transferred to a sterile tube containing 9 ml of sterile saline (0.9 % NaCl), and the suspensions were adjusted to a 0.5 McFarland (McF) of (approx. 1.5 x 10<sup>8</sup> CFU/ml). 1 ml suspensions were cultured on TSA plates at 37 °C for 24 h to verify the McF value.

### In vitro microbial challenge (assay)

One ml of each bacterial suspension was added to the test solution containing a 9 ml mixture of NEW and deionized water. In addition, as a control group, 1 ml of each bacterial suspension was added to 9 ml of sterile tap water. All tubes were vortexed and left at room temperature (21-22 °C) for 10, 30, 60, and 90 min inactivation treatment. At the end of the treatment period, 1 ml of each sample was transferred to 9 ml of neutralizing solution (Phosphate buffered saline, Oxoid, BR0014G) and left at room temperature for 5 min to stop the activity of NEW. 0.1 % peptone water (Oxoid, LP0049) was used for serial dilutions. Each serial dilution representing the test group was plated onto TSA plates and incubated at 37 °C for 24 h. Colonies on TSA plates were counted. All the experiments were performed in duplicate (TSE EN 1276, 2019).

1 ml of each bacterial suspension was added to the test solution containing a 9 ml mixture of NEW and deionized water. At the end of the treatment, 1 ml of each mixture sample was transferred to a tube containing 9 ml of neutralizing solution, then vortexed and incubated for 5 min at room temperature to stop the activity of NEW.

### Statistical analyses

In calculating the study's sample size, Power was determined by taking at least 80 % and a Type-1 error of 5 % for each variable. Shapiro-Wilk ( $n < 50$ ) and Skewness-Kurtosis tests were used to check whether the continuous measurements in the study were normally distributed, and Parametric tests were applied because the measurements were normally distributed. "ANOVA" was used in "periods (minutes)" and "between groups" comparisons, with "two-factor, one-factor repeated" measurements. The "Bonferroni posthoc test" was used to determine the periods and groups that account for the difference. The statistical significance level was assumed to be  $p < 0.05$  in the calculations, and the SPSS (IBM SPSS for Windows, ver.26) statistical package program was used for the analyses.

## RESULTS

Our study examined the antimicrobial effect of NEW on *L. monocytogenes*, an important foodborne pathogen. The effectiveness of the disinfectant was measured at different dosages and exposure times.

Disinfectant concentrations of 0.1 % (4.99 mg.l-1), 5 % (24.97 mg.l-1), 10 % (49.94 mg.l-1), 50 % (249.71 mg.l-1), and 90 % (449.48 mg.l-1) were used to assess the efficacy of NEW on *L. monocytogenes*. The effectiveness of the disinfectant is affected by the level of free active chlorine. The level of free active chlorine in NEW used in our study is 499.42 mg.l-1. The free active chlorine level at each dilution level was calculated separately, and the disinfection efficacy was determined. The effect of NEW at different concentrations and times on the surviving population

of *L. monocytogenes* is shown in Table 1. Table 1 shows two-way comparison results of the concentration measurements "according to Group and Period (minutes)".

According to the results of the study, a concentration of 0.1 % was not effective; a decrease of around 1 log<sub>10</sub> CFU/ml was achieved in all minutes. The disinfectant was observed to have a strong effect at the 90<sup>th</sup> and 120<sup>th</sup> min at 5 % concentration. No statistically significant difference between the minute measurement periods was observed in the 0.1% concentration group ( $p = 0.102$ ). As a result; There was no significant change in the time-dependent measurements in this group. Similar; No statistically significant difference was observed between the minute measurement periods in the 5% concentration and control groups ( $p = 0.113$  and  $p = 0.128$ ) There was no significant change in the time-dependent measures in these groups.

At concentrations of 10 %, 50 %, and 90 %, the number of *L. monocytogenes* decreased to undetectable limits – as determined by plating procedures – at any time, including 30 min of exposure to NEW. In the control samples, no significant reduction in bacterial counts was achieved after 30, 60, 90, and 120 min.

In the 30<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup>, and 90<sup>th</sup> minute of the concentration measurement; A statistically significant difference between the groups was observed ( $p = 0.001$ ). The groups that make up the differences are indicated with lowercase letters. In this period, the control group was found to be different from all other groups with the highest value. Despite that, In the 120<sup>th</sup> minute period, No statistically significant difference was observed "according to the groups" ( $p = 0.056$ ).

In the current study, the efficacy of disinfectant containing 24.97 mg.l-1 was determined at 90 min, but when the chlorine level was 49.94 mg.l-1, it decreased to 30 min. With increasing disinfectant concentration, it was observed that NEW strongly affected *L. monocytogenes* even in the short period of contact time. According to our results, NEW was effective for the concentrations and periods.

**Table 1.** Surviving population (log<sub>10</sub> CFU/ml) of *L. monocytogenes*

Time (min)	30	60	90	120	**p.	
	*Med±SD	Med±SD	Med±SD	Med±SD		
Concentrations %	0.1 %	6.98±.01 b	6.67±.04 b	7.15±.02 b	7.22±.00	.102
	5 %	3.16±.01 c	1.95±.00 c	*ND c	ND	.113
	10 %	ND d	ND d	ND c	ND	.
	50 %	ND d	ND d	ND c	ND	.
	90 %	ND d	ND d	ND c	ND	.
	Control	7.23±.02 a	7.38±.01 a	7.41±.01 a	7.30±.00	.128
*p.	.001	.001	.001	.056		

\*ND: Not detected of viable *L. monocytogenes* on TSA plates

\*Med, median; SD\*, standard deviation (The significance level of the difference between the concentration groups in the same period (a,b,c: shows different groups according to Bonferroni Post Hoc test)

\*\* The significance level of the difference between periods in the same concentration group

## DISCUSSION

*Listeria* spp., which can cause meningitis, miscarriage, and death, is an important microorganism for the food industry. *L. monocytogenes* can be found in food and the environment, especially in the food industry (Buchanan et al. 2004; Kara and Aslan 2021; Sepin and Pamuk 2021). A good cleaning and disinfection process should be done to protect from *Listeria* spp. in terms of food and public health (Pedreira et al. 2021). NEW is at the forefront of new-generation disinfectants due to their strong bactericidal effect as well as not harming the environment, people, and animals (Al-Qadiri et al. 2019; Chen and Wang 2022). NEW is an efficient disinfectant in the food industry (Huang et al. 2008; Cui et al. 2009).

NEW has been widely used in studies on the inactivation of *L. monocytogenes* in various foods and surfaces. Ovissipour et al. (2018) reported that AEW and NEW inactivation of *L. monocytogenes* in salmon fillets were more effective, even at different temperatures. NEW had less effect on salmon protein quality than AEW. The number of surviving *L. monocytogenes* in tomatoes washed with NEW containing 89 mg.l<sup>-1</sup> chlorine was reduced to <1 log CFU after 5 min (Deza et al. 2003). Rivera-Garcia et al. (2019) analyzed the efficacy of NEW for *L. monocytogenes* on the eggshell surfaces and reported that a reduction of 2.18 log<sub>10</sub> CFU/egg was achieved, and no color change was observed in the eggshells.

The number of surviving *L. monocytogenes* on disinfected surfaces (glass and stainless steel surfaces) using NEW with an active chlorine concentration of 63 mg.l<sup>-1</sup> was determined to be 0.18-0.19 log CFU ml<sup>-1</sup> in the study by Deza et al. (2005). Using NEW (64.92 mg.l<sup>-1</sup>), a reduction in *L. monocytogenes* biofilms on glass and stainless steel surfaces was determined, and *L. monocytogenes* decreased to undetectable levels in 10 min (Arevalos-Sánchez et al. 2012). Possas et al. (2021) found a reduction from 1.55 to 5.22 log CFU/cm<sup>2</sup> was achieved on stainless steel coupons. These results were consistent with present studies reporting that NEWs could be used as an effective disinfectant to inactivate *L. monocytogenes* in the food industry. Although a large number of studies have been conducted with NEW, many of these studies aimed to determine the efficacy of NEW *in vivo*. However, our results are consistent with those studies, despite the fact that the studies were conducted *in vivo* makes it difficult to compare their efficacy. Although our study conducted *in vitro* offers an advantage in terms of the direct contact of the disinfectant with bacteria but also represents a disadvantage since any bacteria present must be destroyed. In washing studies, effectiveness is expected to be lower as the number of bacteria to be controlled spreads to the surface.

In a study with acidic (pH 2.3) and basic (pH 11.5) electrolyzed water, AEW was found to be effective in inactivating *L. monocytogenes*, while BEW was not

found to be ineffective. AEW applications detected 4 log bacteria for 15 min at 4 °C, although no bacteria were detected for 10 min at 25 °C (Fabrizio and Cutter 2003). Ovissipour et al. (2015) analyzed the effectiveness of acidic and alkaline electrolyzed water in cell suspensions for 2, 4, and 6 min at room temperature. According to this study, acidic EW is more effective than alkaline EW in inactivating pure cell suspensions of *L. monocytogenes*. In another study, EW with an available chlorine concentration of 5-10 mg.l<sup>-1</sup> and a pH of 6 achieved a reduction of 5-6 log CFU/ml after 30, 60, and 90 sec (Rahman et al. 2012). Although the AEW effects are high, the use of NEW in the food industry is recommended due to the disadvantages (corrosion on surfaces, irritation on mucous membranes, etc.) of acidic electrolyzed water. In the current study, NEW was effective at all disinfectant concentrations and time periods by completely inactivating *L. monocytogenes*, while *L. monocytogenes* numbers survived without reduction in tap water control groups. In the present study, a concentration of 0.1 % NEW was ineffective in reducing *L. monocytogenes*, while concentrations of 10 %, 50 %, and 90 % reduced it to undetectable limits. The results of this study are consistent with previous studies confirming that NEW has potent antimicrobial activity against *L. monocytogenes* *in vitro* (as a pure culture). Deza et al. (2005) found that in pure cultures of *L. monocytogenes*, about 7 logs were reduced after 5 min exposure to NEW. In another study, *L. monocytogenes* was exposed to NEW (pH 6.8 and Cl 46 mg.l<sup>-1</sup>) for 30 seconds and under *in vitro* conditions. After treatment, a 6.1 log<sub>10</sub> CFU/ml reduction was determined (Rivera-Garcia et al. 2019). Hamidi et al. (2021) reported that *L. monocytogenes* were completely inactivated by NEW in pure culture at concentrations of 50, 100, and 200 µg/ml and in 2 min contact time. Another *in vitro* assay reported that *L. monocytogenes* levels decreased to less than 3 log CFU/ml (Torres-Rosales et al. 2020). *In vitro* studies demonstrated that NEW could reduce the bacterial load and exerts a bactericidal effect on *L. monocytogenes*.

The effectiveness of the NEW disinfectant varies depending on contact time and concentration. In the current study, the effectiveness of a 25 µg/kg disinfectant was determined after 90 min, but it decreased to 30 min with a chlorine level of 50 µg/kg. These results are consistent with previous studies that reported that disinfectant efficacy increased with increasing application time and concentration (Sheng et al., 2020; Hamidi et al., 2021).

## CONCLUSIONS

In conclusion, this study found that neutral electrolyzed water is highly effective in the

conditional inactivation of *L. monocytogenes* in vitro. In addition, the antimicrobial activity of NEW against *L. monocytogenes* increases as the concentration and application time increase. *L. monocytogenes*, an important food industry, and public health pathogen, can be easily inactivated by NEW disinfectant applied at appropriate concentrations and contact times. The use of NEW, which is easy to use and, does not cause harm to the environment, people, and food quality, unlike traditional disinfectants in the food industry, should be increased. The efficacy of NEW against other microorganisms should be evaluated in new studies, particularly in the in vitro setting. In this way, the effectiveness of the disinfectant can be proven by further studies.

**Conflict of interest:** The authors have no conflicts of interest to report.

**Authors' Contributions:** GÇ, AA and GMB contributed to the project idea, design of the study. GMB and ÇSN performed the experiments, data analysis and wrote the final manuscript. GÇ and GMB analyzed the experimental data and discussed the research results. GMB performed literature search, drafted and wrote the first draft of the manuscript. GÇ and AA supervised the work and reviewed/edited the manuscript critically. All the authors have read and approved the finalized manuscript.

**Ethics Committee Information:** “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.”

**Explanation:** We have presented as a poster at the 10th Balkan Congress of Microbiology/Microbiologia Balkanica (2017).

## REFERENCES

- Al-Qadiri, H. M., Smith, S., Sielaff, A. C., Govindan, B. N., Ziyaina, M., Al-Alami, N., & Rasco, B. (2019). Bactericidal activity of neutral electrolyzed water against *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* in cell suspensions and artificially inoculated onto the surface of selected fresh produce and polypropylene cutting boards. *Food control*, 96, 212-218. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.019>
- Arevalos-Sánchez, M., Regalado, C., Martín, S. E., Domínguez-Domínguez, J., & García-Almendárez, B. E. (2012). Effect of neutral electrolyzed water and nisin on *Listeria monocytogenes* biofilms, and on listeriolysin O activity. *Food Control*, 24(1-2), 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.012>
- Buchanan, R., R. Lindqvist, T. Ross, M. Smith, E. Todd, R. Whiting (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Microbiological Risk Assessment Series, 4. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome (Italy).
- Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., & Raposo, A. (2021). Microbial biofilms in the food industry—A comprehensive review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(04), 2014. <https://doi.org/10.3390/ijerph18042014>
- Chen, B. K., & Wang, C. K. (2022). Electrolyzed water and its pharmacological activities: A mini-review. *Molecules*, 27(4), 1222. <https://doi.org/10.3390/molecules27041222>
- Coban, A., Pennone, V., Sudagidan, M., Molva, C., Jordan, K., & Aydin, A. (2019). Prevalence, virulence characterization, and genetic relatedness of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken retail points and poultry slaughterhouses in Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50, 1063-1073. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00133-y>
- Cui, X., Shang, Y., Shi, Z., Xin, H., & Cao, W. (2009). Physicochemical properties and bactericidal efficiency of neutral and acidic electrolyzed water under different storage conditions. *Journal of Food Engineering*, 91(4), 582-586. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.006>
- Deshmukh, S. P., Patil, S. M., Mullani, S. B., & Delekar, S. D. (2019). Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 954-965. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.102>
- Deza, M. A., Araujo, M., & Garrido, M. J. (2005). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces by neutral electrolysed water. *Letters in applied microbiology*, 40(5), 341-346. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01679.x>
- Deza, M. A., Araujo, M., & Garrido, M. J. (2003). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes by neutral electrolyzed water. *Letters in applied microbiology*, 37(6), 482-487. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01433.x>
- Ding, T., & Liao, X. (2019). Decontamination efficacy and principles of electrolyzed water. In *Electrolyzed Water in Food: Fundamentals and Applications* (pp. 17-38). Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3807-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3807-6_2)
- Fabrizio, K. A., & Cutter, C. N. (2003). Stability of electrolyzed oxidizing water and its efficacy against cell suspensions of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 66(8), 1379-1384. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.8.1379>
- Hamidi, R. M., Shekarforoush, S. S., Hosseinzadeh, S., & Basiri, S. (2021). Near Neutral Electrolyzed Water and Peroxyacetic Acid and Their Effect on the Survival of *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* Inoculated on Poultry Meat. *Food Protection Trends*, 41(4).
- Huang, Y. R., Hung, Y. C., Hsu, S. Y., Huang, Y. W., & Hwang, D. F. (2008). Application of electrolyzed water in the food industry. *Food control*, 19(4), 329-345. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.08.012>
- Iram, A., Wang, X., & Demirci, A. (2021). Electrolyzed oxidizing water and its applications as sanitation and cleaning agent. *Food Engineering Reviews*, 13, 411-427. <https://doi.org/10.1007/s12393-021-09278-9>

- Jee, D. Y., & Ha, J. W. (2021). Synergistic interaction of tap water-based neutral electrolyzed water combined with UVA irradiation to enhance microbial inactivation on stainless steel. *Food Research International*, 150, 110773. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110773>
- Jee, D. Y., & Ha, J. W. (2023). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on stainless steel by synergistic effects of tap water-based neutral electrolyzed water and lactic acid. *Food Microbiology*, 112, 104233. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104233>
- Kara, R., & Aslan S. (2021). Investigation of *Listeria monocytogenes* in workers, equipment and environments at kaymak processing plants. *Food Science and Technology*, 41, 449-452. <https://doi.org/10.1590/fst.02620>
- Martínez-Suárez, J. V., Ortiz, S., & López-Alonso, V. (2016). Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. *Frontiers in microbiology*, 7, 638. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00638>
- Medina-Gudiño, J., Rivera-Garcia, A., Santos-Ferro, L., Ramirez-Orejuel, J. C., Agredano-Moreno, L. T., Jimenez-Garcia, L. F., ... & Cano-Buendia, J. A. (2020). Analysis of Neutral Electrolyzed Water antibacterial activity on contaminated eggshells with *Salmonella enterica* or *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology*, 320, 108538. <https://doi.org/10.1016/j.jiffoodmicro.2020.108538>
- Mısırlı, F., & Aydın, A. (2011). Effectiveness of different disinfectants used in the food production facility on selected foodborne pathogens. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(suppl ), 167-171. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2010.3500>
- Ovissipour, M., Al-Qadiri, H. M., Sablani, S. S., Govindan, B. N., Al-Alami, N., & Rasco, B. (2015). Efficacy of acidic and alkaline electrolyzed water for inactivating *Escherichia coli* O104: H4, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, and *Vibrio parahaemolyticus* in cell suspensions. *Food Control*, 53, 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.006>
- Ovissipour, M., Shiroodi, S. G., Rasco, B., Tang, J., & Sablani, S. S. (2018). Electrolyzed water and mild-thermal processing of Atlantic salmon (*Salmo salar*): Reduction of *Listeria monocytogenes* and changes in protein structure. *International journal of food microbiology*, 276, 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.jiffoodmicro.2018.04.005>
- Pedreira, A., Taşkın, Y., & García, M. R. (2021). A critical review of disinfection processes to control SARS-CoV-2 transmission in the food industry. *Foods*, 10(2), 283. <https://doi.org/10.3390/foods10020283>
- Pogreba-Brown, K., Boyd, K., Schaefer, K., Austhof, E., Armstrong, A., Owusu-Dommey, A., ... & Hoffman, S. (2022). Complications Associated with Foodborne Listeriosis: A Scoping Review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 19(11), 725-743. <https://doi.org/10.1089/fpd.2022.0012>
- Possas, A., Pérez-Rodríguez, F., Tarlak, F., & García-Gimeno, R. M. (2021). Quantifying and modelling the inactivation of *Listeria monocytogenes* by electrolyzed water on food contact surfaces. *Journal of Food Engineering*, 290, 110287. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110287>
- Rahman, S. M. E., Park, J. H., Wang, J., & Oh, D. H. (2012). Stability of low concentration electrolyzed water and its sanitization potential against foodborne pathogens. *Journal of Food Engineering*, 113(4), 548-553. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.07.011>
- Rivera-Garcia, A., Santos-Ferro, L., Ramirez-Orejuel, J. C., Agredano-Moreno, L. T., Jimenez-Garcia, L. F., Paez-Esquiliano, D., ... & Cano-Buendia, J. A. (2019). The effect of neutral electrolyzed water as a disinfectant of eggshells artificially contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Food science & nutrition*, 7(7), 2252-2260. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1053>
- Sepin, Ö., & Pamuk, Ş. (2021). Afyonkarahisar'da satışa sunulan tavuk iç organlarından *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes*' in immünomagnetik seperasyon yöntemi ile izolasyonu ve izolatların antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 14(2), 201-209. <https://doi.org/10.30607/kvj.839629>
- Sheng, L., Shen, X., Ulloa, O., Suslow, T. V., Hanrahan, I., & Zhu, M. J. (2020). Evaluation of JC9450 and neutral electrolyzed water in controlling *Listeria monocytogenes* on fresh apples and preventing cross-contamination. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3128. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03128>
- Shiroodi, S., Schwarz, M. H., Nitin, N., & Ovissipour, R. (2021). Efficacy of nanobubbles alone or in combination with neutral electrolyzed water in removing *Escherichia coli* O157: H7, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Listeria innocua* biofilms. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 287-297. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02572-0>
- Şahin, S., & Ayyıldız, A. (2020). Sivas ilinde satılan çiğ inek ve manda sütlerinde *Listeria* spp. varlığının araştırılması. *Kocatepe Veterinary Journal*, 13(1), 19-24. <https://doi.org/10.30607/kvj.645718>
- Torres-Rosales, E., Rivera-Garcia, A., Rosario-Perez, P. J., Ramirez-Orejuel, J. C., Paez-Esquiliano, D., Martinez-Vidal, S., ... & Cano-Buendia, J. A. (2020). Application of Neutral Electrolyzed Water on pork chops and its impact on meat quality. *Scientific Reports*, 10(1), 19910. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76931-4>
- TSE EN 1276 of Turkish Standards Institution of 2019. On Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas - Test method and requirements (phase 2, step 1)
- Xie, J., Sun, X., Pan, Y., & Zhao, Y. (2012). Combining basic electrolyzed water pretreatment and mild heat greatly enhanced the efficacy of acidic electrolyzed water against *Vibrio parahaemolyticus* on shrimp. *Food Control*, 23(2), 320-324. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.019>
- Xuan, X., & Ling, J. (2019). Generation of electrolyzed water. Electrolyzed water in food: Fundamentals and applications. Singapore: Springer Singapore.
- Yuan, L., Sadiq, F. A., Wang, N., Yang, Z., & He, G. (2021). Recent advances in understanding the control of disinfectant-resistant biofilms by hurdle technology in the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(22), 3876-3891. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1809345>
- Zhao, L., Li, S., & Yang, H. (2021). Recent advances on research of electrolyzed water and its applications. *Current Opinion in Food Science*, 41, 180-188. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.03.004>



## Determining The Presence of Equine Herpesvirus-1 and Equine Herpesvirus-4 Infections by Real-Time PCR in Horses in Kars Region

Ayhan AKMAN<sup>1\*</sup>, Rahşan AKPINAR<sup>1</sup>, Semistan KIZILTEPE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Samsun Veterinary Control Institute, 55200, Samsun, Türkiye,

<sup>2</sup>Iğdır University, Tuzluca Vocational School, Department of Veterinary Health, Iğdır, Türkiye

### ABSTRACT

Horse herpesvirus infections are significant from a clinical, financial, and epidemiological standpoint. EHV-1 and EHV-4 are two of the ones that contribute to outbreaks. In this study, blood samples taken from 138 horses with or without symptoms in Kars region were examined for EHV-1 and EHV-4. EHV-1 was detected in 40 (29%) blood samples, EHV-4 was detected in 49 (35,5%) blood samples and both agents were detected in 24 (17,4%) blood samples by Real-Time PCR technique. The results suggest that, in addition to care-feeding and environmental factors, the strategic location of the Kars region should be considered in the fight against the viral agents infections.

**Key words:** Blood, EHV-1, EHV-4, Horse, Real-Time PCR

\*\*\*

## Kars Bölgesindeki Atlarda Real-Time PCR ile Equine Herpesvirus-1 ve Equine Herpesvirus-4 Enfeksiyonlarının Araştırılması

### ÖZ

Atlarda herpesvirus enfeksiyonları klinik, ekonomik ve epidemiyolojik açıdan önemli bir yere sahiptir. Bunların içerisinde EHV-1 ve EHV-4 salgınlara neden olan etkenler arasındadır. Bu çalışmada Kars bölgesinde semptom gösteren veya göstermeyen 138 adet attan alınan kan örnekleri EHV-1 ve EHV-4 yönünden incelenmiş olup EHV-1 40 (%29) adet kan örneğinde, EHV-4 ise 49 (%35,5) adet kan örneğinde, 24 (%17,4) adet kan örneğinde ise her iki etken Real-Time PCR tekniği ile tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular neticesinde bakım-besleme, iklim koşulları yanında Kars bölgesinin konum açısından stratejik bir yerde bulunması EHV-1 ve EHV-4 enfeksiyonları ile mücadelede dikkat edilmesi gereken bir husus olarak ortaya çıkmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** At, EHV-1, EHV-4, Kan, Real-Time PCR

To cite this article: Akman A, Akpınar R, Kızıltepe S. Determining The Presence Of Equine Herpesvirus-1 And Equine Herpesvirus-4 Infections By Real-Time Pcr In Horses In Kars Region. (2023):16(4): 580-587

Submission: 06.10.2023 Accepted: 05.12.2023 Published Online: 14.12.2023

ORCID ID; AA: 0000-0003-0152-0481 RA: 0000-0003-0075-9247 SK: 0000-0003-3727-8893

\*Corresponding author e-mail: [ayhanakman83@hotmail.com](mailto:ayhanakman83@hotmail.com)

## INTRODUCTION

Equine herpesvirus types 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) are the most prevalent types, and they can infect horses, donkeys and mules (Crabb et al., 1991). EHV-1 and EHV-4 are DNA viruses that are a part of the subfamily *Alphaherpesvirinae*. (Patel and Heldens, 2005).

Equestrian herpesvirus-related illnesses cause the worldwide equine sector to suffer considerable financial losses. Nine distinct varieties of equid herpesviruses (EHV-1 to EHV-9) have been found via investigations to far (Davison et al., 2009, Abdelgawad et al., 2016). In horses, the most significant pathogens in terms of clinical care, economics, and epidemiology are EHV-1 and EHV-4 (Patel and Heldens, 2005), both of which have the potential to spark severe outbreaks of respiratory diseases (Allen and Bryans 1986).

Despite being assumed to have less economical and veterinarian impact than EHV-1 and EHV-4 (Borchers et al., 1997), EHV-2 and EHV-3-related illnesses are more common (Palif et al., 1978, Browning and Studdert, 1987, Blanchard et al., 1992). According to reports, EHV-4 is only found in the lymph nodes that drain the lungs and respiratory epithelium. EHV-1, however, can result in systemic infections (Patel and Edington, 1983). EHV-1 and EHV-4 have latent infection potential, just like other herpesviruses. A key element in the transmission of illness to vulnerable animals is repeated viral shedding via asymptomatic carriers at irregular intervals (Patel and Heldens, 2004).

In EHV-1 and EHV-4, the glycoprotein B (gB) gene's nucleotide sequence was identified (Riggio et al., 1989, Whalley et al., 1989). The only gene in the *Herpesviridae* family that has not undergone mutation is one that is essential for viral replication (Wagner et al., 1992). Therefore, it is unlikely that the sequence

will vary across isolates of the identical EHV type. While there is significant conservation in the first 500 nucleotides of the coding sequences of EHV-1gB and EHV-4gB, it was discovered that some sequence sections are specific to each EHV type (Wagner et al., 1992).

The most widely used method to detect equine herpesviruses by laboratory diagnosis is virus isolation in cell culture. The virus's stability is essential to the success of EHV isolation. Herpesviruses are unstable and generally undetectable in clinical specimens that have not been refrigerated or otherwise mishandled (Wagner et al., 1992).

## MATERIALS and METHODS

This study was carried out in Samsun Veterinary Control Institute with the permission of Kafkas University Animal Experiments Local Ethics Committee with the letter dated 29.08.2022 and numbered 2022/137.

Blood was drawn into tubes containing EDTA from 138 unvaccinated symptomatic and asymptomatic equids up to the age of 2 years from the Kars region. The samples were randomly selected from privately owned unregistered horses in different regions of Kars in 2022. The buffy coat fraction from the centrifuged blood samples was removed using a capillary pipette after a ten-minute spin at 1500 g. Multiplex Real-Time PCR was utilized to recognize the DNA of EHV-1 and EHV-4 in buffy coat cells. Nucleic acid of all samples were initially extracted for this purpose using the Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Lot: 53059300). Afterwards, Real-Time PCR operations were applied using SsoAdvanced Universal Inhibitor-Tolerant SYBR Green Supermix (Cat:172-5017). EHV-1 and EHV-4 were

distinguished using PCR primers based on a difference in sequence between the two EHV species. It was decided to use the nucleotide sequence of the glycoprotein B (gB) genes from the viral agents (Riggio et al., 1989, Whalley et al., 1989). The *Herpesviridae* family's most conserved gene, gB, is necessary for viral replication (Wagner et al., 1992). To find nucleic acids of the viral agents in the samples, real-time PCR was used. For this purpose, primers (Table 1) were used (Wagner et al., 1992). The following combination was made according to the manufacturer's instructions, with a final reaction volume of 20 µl: 5 µl template DNA, 4 µl nuclease-

free water, 0.5 µl of forward and reverse primer solution in 10 M, and 10 µl 2X SsoAdvanced universal SYBR® Green supermix (Bio-Rad Laboratories, USA) for Real-Time PCR testing. Using a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (USA: Bio-Rad Laboratories), a 98 °C activation phase for three minutes was followed by 40 cycles of denaturation for fifteen seconds at 98 °C and annealing and elongation for thirty seconds at 60 °C. The melting curve was created using dwell times of 5 seconds at temperatures ranging from 65 °C to 95 °C. The mixtures prepared in different tubes for both agents were subjected to the same reaction.

**Table 1.** Primer sequences, target regions and sizes used in Real-Time PCR tests

**Table 1.** Real-Time PCR testlerinde kullanılan primer dizileri, hedef bölgeler ve büyüklükleri

Primer	Index (5'----- 3')	Target region	Size(bp)	Reference
EHV-1 F	TACTCCCACTTCCATGTCAACG	Glycoprotein B (gB)	135	Wagner et al., 1992
EHV-1 R	GCAGGTGTAAAAGTCTCCATCC			
EHV-4 F	CGTGTCTCTCGCTTCTATACACC		326	
EHV-4 R	GTAAAAGTCTCCATCCTCTGCG			

## RESULTS

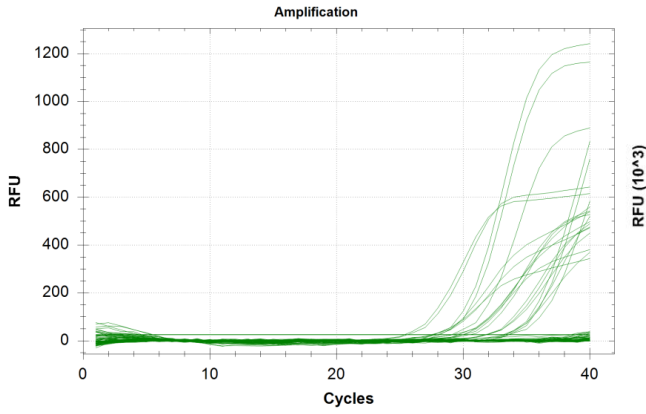
In this study, PCR tests were performed on DNA extracts obtained from blood samples collected from 138 horses in the Kars region (Figure 1, 2, and 3). As a result of PCR, EHV-1 was detected in 40 (29%)

horse blood samples and EHV-4 was detected in 49 (35.5%) horse blood samples. There were 24 samples (17.4%) which EHV-1 and EHV-4 were both found (Table 2).

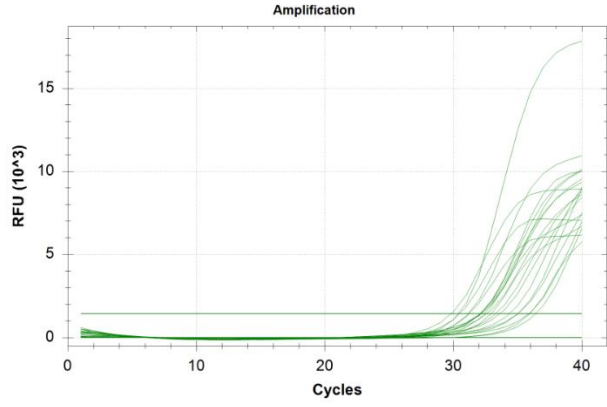
**Table 2.** Number of EHV-1, EHV-4 and mixed infections (EHV-1 and EHV-4) as a result of Real-Time PCR

**Table 2.** Real-Time PCR sonucunda EHV-1, EHV-4 ve miiks enfeksiyonların (EHV-1 ve EHV-4) sayısı

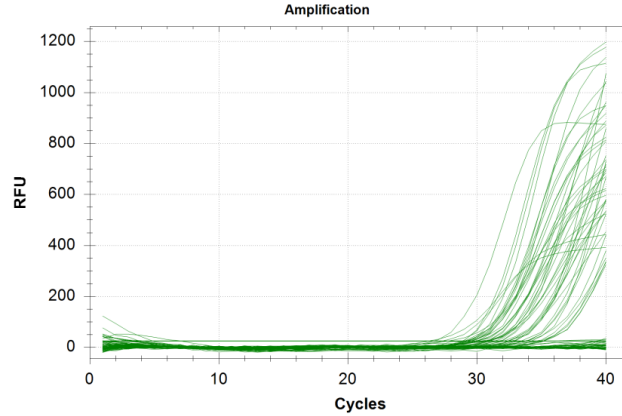
Virus	Positive	Negative
EHV-1	40 (29%)	98 (71%)
EHV-4	49 (35,5 %)	89 (64,5%)
Mixed infection (EHV-1 and EHV-4)	24 (17,4%)	



**Figure 1.**



**Figure 2.**



**Figure 3.**

**Figure 1, 2, 3.** Real-Time PCR image of EHV-1 and EHV-4

**Şekil 1,2,3.** EHV-1 ve EHV-4'ün Real-Time PCR görüntüsü

## DISCUSSION

EHV-1 and EHV-4 have an endemic feature in the equine population in the world (Allen and Bryans, 1986, Allen et al., 1999). Many nations throughout the world have reported widespread the agents infections (Canada, New South Wales, Australia, India, Kyrgyzstan and Sweden). Seroprevalence rates for EHV-1 and EHV-4 are reported to be 8-85.2% and about over 90%, respectively, worldwide (Keane et al., 1988, Crabb and Studdert, 1993, Gilkerson et al., 1999, Nordengrahn et al., 1999, Singh et al., 1999, Avci et al., 2014). It has been emphasized that especially serotypes EHV-1 and EHV-4 are more important in herpesvirus infections in horses than other serotypes in terms of the frequency of occurrence, severity and effects of the infections they cause (Tekelioglu, 2016). EHV-4, on the other hand,

causes sporadic cases in horses, upper respiratory tract infections in all seasons and rarely abortions (1%). Clinically, the disease caused by EHV-4 cannot be distinguished from infections caused by EHV-1. Latent infections, usually due to EHV-4, have been reported in horses. Contamination occurs by the ingestion of the agent, which infected horses emit as an aerosol through nasal discharge and respiratory tract, from the respiratory system by susceptible horses. In addition, contaminated feeders, drinkers, farm equipment, waste fetal membranes and personnel clothing are other important sources of contamination (Tekelioglu and Akay, 2003, Tekelioglu et al., 2006, Anonymous, 2022).

Various diagnostic methods can be used in the diagnosis of EHV-1 infection. The important point to be considered here is the cross-reactions that

will occur with EHV-4. Conventional serological testing is unable to distinguish between the viral agents because of substantial antigenic cross-reaction with EHV-4, prior immunization, cross-reactivity of antibodies and maternal antibodies against the viral agents (Yasunaga et al., 1998, Carvalho et al., 2000, Allen et al., 2004, Harless and Pusterla 2006, Diallo et al., 2007, Sellon and Long 2007). Type-specific diagnostic techniques should be utilized for this, and the PCR is the most sensitive of them all. (Tearle et al., 2003). Standard virological methods are considered the "gold standard", but examining large numbers of specimens in particular is both cumbersome and time consuming. Utilizing molecular diagnostic methods currently necessitates the laboratory detection of various animal viruses (Carvalho et al., 2000, Milic et al., 2010, Nisavic et al., 2010, Ohta et al., 2011, Nisavic et al., 2016). Additionally, taking into account the test's sensitivity, PCR is an appropriate screening method for detecting latent EHV-1 and EHV-4 infections in horses (Welch et al., 1992, Kirisawa et al., 1993, Borchers et al., 1997, Allen, 2006, Pusterla et al., 2012). The signal intensities and quantification findings are unaffected by changes within the sequence covered by the primers, making Real-Time PCR technology a precise, straightforward, sensitive, rapid, and quantitative tool for identifying infectious illnesses (Hussey et al., 2006, Watzinger et al., 2006, Diallo et al., 2007, Slater, 2007, Pusterla et al., 2009, Milic et al., 2010). The OIE Reference Laboratories use q-Real-Time PCR tests that seek for heterologous sequences of important glycoprotein genes to discriminate between EHV-1 and EHV-4 among herpesvirus strains (OIE, 2015). . Using primers that focused on the glycoprotein B (gB) gene region, known as the conserved area in *Herpesviridae*, multiplex Real-Time PCR was performed to precisely identify the EHV-1 and EHV-4 agents in our investigation.

In this investigation, blood samples from 138 horses in the Kars region were drawn, and EHV-1 and EHV-4 were found in 40 (29%) and 49 (35.5%) respectively. Both virus agents were detected in 24 blood samples (17.4%). Kars is located in the east of Turkey and has a strategic position in terms of bordering Armenia and very close to Iran. It is also very close to Igdir and Ardahan, where horse breeding is intense. Considering the animal movements with these regions, the prevalence rates in this study are similar to other studies. Yildirim et al. (2015) used an ELISA test to serologically investigate blood samples obtained from 423 horses in the Kars and Ardahan areas for the viral agents. Antibodies to EHV-1 and EHV-4 were detected in 222 (52.48%) and 354 (83.69%) equine blood samples, respectively. In addition, antibodies to both viruses were detected in 210 (49.65%) blood samples. The reason for the lower prevalence in our study is that detection of EHV-1 and EHV-2 agents from blood samples by PCR is only possible in animals in the acute infection period. Considering that the detection of viral agents in blood samples is only in the viremia phase, the rates we obtained can be considered high. Because it is the first molecular epidemiological study carried out in the Kars area, this work is significant.

As a result of their serological study on EHV-1 and EHV-4 in working horses in eastern Turkey, Ataseven et al. (2010) detected that the region's high seroprevalence rates were relatively high for the area's number of horses per household ( $\geq 10$  heads), stressful working conditions, new herds in the area, changing climatic conditions, and illegal border trade. The researchers pointed out that illicit border trafficking of horses from Turkey to Iran was another reason for the high seroprevalence found. Equine herpesvirus disease development is correlated with elements including climatic conditions, population density, management practices, transportation, and other diseases (OIE, 2015). In a study conducted with

Real-Time PCR from 200 horse blood in Iran, EHV-4 was found at a rate of 88% and EHV-1 could not be detected (Sarani et al., 2013). Molecular studies on EHV-1 in Iran have reported positivity between 0% and 13.2% (Afshin et al., 2020, Sarani et al., 2013, Taktaz et al, 2015). No studies were found on EHV-1 and EHV-4 in Armenia. In our investigation, the prevalence rate of EHV-4 was found to be higher than that of EHV-1, which indicates that the factor of EHV-4 is more common in horses.

## CONCLUSION

As a result, serological and molecular studies have demonstrated that EHV-1 and EHV-4 cases are widespread in horses, and new strategies need to be developed in the fight against these infections. Uncontrolled animal movements, unsuitable breeding conditions, vaccination procedures and climatic conditions are important for Equine Herpesviruses and strategic decisions should be made on these issues. For the eradication of these diseases, breeders should be informed about the course and control of these diseases. The epidemiological data obtained will shed light on the fight against *Herpesviridae*.

**Conflict of interest:** The authors declare that there are no real, potential or perceived conflicts of interest for this article.

**Authors' Contribution:** The authors declare that they have contributed equally to the manuscript.

**Ethical approval:** This study was approved by KAÜ-HADYEK with number 2022/137 and date 29.08.2022.

## REFERENCES

Abdelgawad A, Damiani A, Ho SYW, Strauss G, Szentiks CA, East ML, Osterrieder N, Greenwood AD. Zebra alphaherpesviruses (EHV-1 and EHV-9): genetic diversity, latency and coinfections. *Viruses*. 2016; 8:262

Afshin R, Madadgar O, Akbarein H, Tazikheh A. Molecular Detection and Phylogenetic Analysis of Equine Herpes Virus-1 in Horses with History or Clinical Signs in Four Provinces of Iran. *Iran J Vet Med*. 2020; 14 (1): 28-35.

Allen GP and Bryans JT. Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus 1 infections. *Progr. Vet. Microbiol. Immunol*. 1986; 2: 78-144.

Allen GP, Kydd JH, Slater JD, Smith KC. Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion. In: Wernery, U., Wade, J.A., Mumford, J.A., Kaaden, O.R. (Eds.), *Equine Infectious Diseases VIII, Proceedings of the Eighth International Conference*. R&W Publications, Newmarket. 1999; 129–146.

Allen GP, Kydd JH, Slater JD, Smith KC. Equid herpesvirus-1 and equid herpesvirus-4 infections, In: *Infectious diseases of livestock*. Oxford University Press, South Africa, Cape Town. 2004; pp.829-859.

Allen GP. Antemortem detection of latent infection with neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1 in horses. *Am J Vet Res*. 2006; 67: 1401-1405.

Anonymous. <https://www.merckvetmanual.com/respiratory-system/respiratory-diseases-of-horses/equine-herpesvirus-infection>; Accessien date: 06.07.2022.

Ataseven VS, Bilge-Dağalp S, Başaran Z, Keskin S. Seroepidemiological studies of equine herpesvirus 1 and 4 infections in working horses from eastern Turkey. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg*. 2010; 57: 39-42.

Avci O, Yapici O, Bulut O, Kale M, Atli K. Detection of equine herpes virus 1, equine herpes virus 4, and equine arteritis virus antibodies in Kyrgyzstan by ELISA. 3rd European EAVLD Congress. Pisa, Italy, October 12-15. Poster Session, Animal diseases, Poster no: P64. Congress Book. 2014; 153.

Blanchard TL, Kenney RM, Timoney PL. Venereal disease. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1992; 8: 191–203.

Borchers K, Wolfinger U, Goltz M, Broll H, Ludwig H. Distribution and relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) infections. *Arch Virol*. 1997; 142: 917–928.

Borchers K, Wolfinger U, Lawrenz B, Schellenbach A, Ludwig H. Equine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected horses detected by direct in situ PCR. *J Gen Virol*. 1997; 78(5): 1109-14.

Browning BF, Studdert MJ. Genomic heterogeneity of equine betaherpesviruses. *J Gen Virol*. 1987; 68: 1441–1447.

Carvalho RL, Passos MF, Martins S. Development of a differential multiplex PCR assay for equine herpesvirus 1 and 4 as a diagnostic tool. *J Vet Med*. 2000; 47: 351-359.

- Crabb BS, Allen GP, Studdert MJ.** Characterization of the major glycoproteins of equine herpesviruses 4 and 1 and asinine herpesvirus 3 using monoclonal antibodies. *J Gen Virol.* 1991; 72: 2075–2082.
- Crabb BS and Studdert MJ.** Epitopes of glycoprotein G of equine herpesviruses 4 and 1 located near the c-termini elicit type-specific antibody responses in the natural host. *J. Virol.* 1993; 67: 6332-6338.
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E.** The order herpesvirales. *Arch Virol.* 2009; 154:171–177.
- Diallo IS, Hewitson G, Wright LL, Kelly MA, Rodwell BJ, Corney BG.** Multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) and equid herpesvirus 4 (EHV-4). *Vet Microbiol.* 2007; 123(1-3): 93-103.
- Gilkerson JR, Whalley JM, Drummer HE, Studdert MJ, Love DN.** Epidemiology of EHV-1 and EHV- 4 in the mare and foal populations on a Hunter Valley stud farm: are mares the source of EHV-1 for unweaned foals. *Vet Microbiol.* 1999; 68: 27-34.
- Harless W, Pusterla N.** 2006. Equine Herpesvirus 1 and 4 Respiratory Disease in the Horse. *Clin Tech Equine Pract.* 2006; 5: 197-202.
- Hussey SB, Clark R, Lunn KF, Breathnach C, Soboll G, Whalley JM, Lunn DP.** Detection and quantification of equine herpesvirus-1 viremia and nasal shedding by realtime polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 2006; 18(4): 335-42.
- Keane DP, Little PB, Wilkie BN, Artsob H, Thorsen J.** Agents of equine viral encephalomyelitis: correlation of serum and cerebrospinal fluid antibodies. *Can J Vet Res.* 1988; 52: 229-235.
- Kirisawa R, Endo A, Iwai H, Kawakami Y.** Detection and identification of equine herpesvirus-1 and -4 by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 1993; 36(1-2): 57-67.
- Milic N, Nisavic J, Asanin R, Knezevic A, Asanin J, Vidanovic D, Sekler M.** Implementation of polymerase chain reaction (PCR) and Real-time pcr in quick identification of bovine herpesvirus 1. *Vet Glas.* 2010; 64(3-4): 159-167.
- Nisavic J, Milic N, Knezevic A, Jovanovic T.** The application of polymerase chain reaction in detection of bovine herpesvirus 1 in clinical samples. *Acta Vet Hung.* 2010; 60(1): 39-48.
- Nisavic J, Zoric A, Milic N.** The application of molecular methods in the diagnostics of infection of swine caused by porcine circovirus 2. *Vet Glas.* 2016; 70(5-6): 249-258.
- Nordengrahn A, Merza M, Svedlund G, Roneus M, Berndtsson T, Lindholm A, Drummer HE, Studdert MJ, Abusugra I, Gunnarsson E, Klingeborn B.** A field study of the application of a type-specific test distinguishing antibodies to equine herpesvirus-4 and - 1. In: Wernery, U; Wade, JF; Mumford, JA and Kaaden, OR (Eds.), *Equine infectious diseases, Proceedings of the 8th International Conference Equine Infectious Diseases* R&W Publications, Newmarket. 1999; 125-128.
- Ohta M, Manabu N, Koji T, Takashi K, Tomio M.** Evaluation of the Usefulness of a PCR Assay Performed at a Clinical Laboratory for the Diagnosis of Respiratory Disease Induced by Equine Herpesvirus Type 1 in the Field. *J Equine Vet Sci.* 2011; 22(3): 53-56.
- OIE.** Equine rhinopneumonitis (equine herpesvirus -1 and -4). 2015. Available at: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.05.09\\_EQUINE\\_RHINO.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.09_EQUINE_RHINO.pdf); Accession date: 06.07.2022.
- Palif V, Belak S, Molnar.** Isolation of equine herpesvirus 2 from foals, showing respiratory symptoms. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1978; 25: 165–167.
- Patel JR and Edington N.** The pathogenicity in mice of respiratory, abortion and paresis isolates of equine herpesvirus 1. *Vet Microbiol.* 1983; 8: 301 -305.
- Patel JR, Heldens J.** Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. *Vet J.* 2005; 170: 14–23.
- Pusterla N, Wilson WD, Mapes S, Finno C, Isbell D, Arthur RM, Ferraro GL.** Characterization of viral loads, strain and state of equine herpesvirus-1 using real-time PCR in horses following natural exposure at a racetrack in California. *Vet J.* 2009; 179(2): 230-9.
- Pusterla N, Mapes S, Wilson WD.** Prevalence of latent alpha-herpesviruses in Thoroughbred racing horses. *Vet J.* 2012; 193(2): 579-82.
- Riggio MP, Cullinane AA, Onions DE.** Identification and nucleotide sequence of the glycoprotein gB gene of equine herpesvirus 4. *J Virol.* 1989; 63: 1123-1133.
- Sarani A, Mohammadi G, Mayameei A, Akbari M.** Investigation of equine herpesvirus-1 and 4 infections in equine population of iran by real-time PCR. *HVM.* 2013; 5(1): 29-33.
- Sellon D, Long M.** Equine herpesviruses, In: Slater, j. (Ed.) *Equine Infectious Diseases.* 2007; pp.134-153 Saunders.

- Singh BK, Yadav MP, Uppal PK, Rattan B.** National assessment of equine herpesvirus-1 infection among equidae in India. In: Wernery, U; Wade, JF; Mumford, JA and Kaaden, OR (Eds.), Equine infectious diseases, Proceedings of the 8th International Conference Equine Infectious Diseases. R&W Publications, Newmarket. 1999; pp: 578-579.
- Slater J.** Equine Herpesviruses. In Equine Infectious Diseases, Ed; Sellon D, Long MT, 2nd Ed., Saunders Elsevier, USA. 2007; pp 134-153.
- Taktaz HT, Nekoei S, Vazirian B, Doosti A, Khamesipour F, Anyanwu MU.** Molecular detection of equine herpesvirus types 1 and 4 infection in healthy horses in Isfahan central and Shahrekord southwest regions, Iran. Biomed Res Int. 2015; 1-7.
- Tekelioglu BK.** At Viral Hastalıkları ve Türkiye’de Neonatal Ölen Tayların Organlarında EHV-1 DNA’sı ile burun sürüntülerinde EHV-4 DNA’sının saptanması. JTHES. 2016: 7-15.
- Tekelioglu BK and Akay O.** Yarış Atlarında Equine Herpesvirüs (EHV-1 ve EHV-4) İnfeksiyonlarının Polymerase Chain Reaction (PCR) ile saptanması. 1st National Virology Congress Kuşadası Aydın Türkiye. 2003.
- Tekelioglu BK , Matsumura T, Tsujimura K, Turan N, Ekici H, Yilmaz H.** Detection of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV1) DNA in Organs of Neonatal Dead Foals in Turkey. J Equine Sci. 2006; 17(1):23-26.
- Tearle PJ, Smith CK, Platt A, Hannant D, Poynter JN, Mumford J.** In vitro characterisation of high and low virulence isolates of equine herpesvirus 1 and 4. Res Vet Scie. 2003; 75:83-86.
- Wagner WN, Bogdan J, Haines D.** Detection of equine herpesvirus and differentiation of equine herpesvirus type 1 from type 4 by the polymerase chain reaction. Can J Microbiol. 1992; 38: 1193-1196.
- Watzinger F, Ebner K, Lion T.** Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. Mol Aspects Med. 2006; 27: 254-298.
- Welch HM, Bridges CG, Lyon AM, Griffiths L, Edington N.** Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. J Gen Virol. 1992; 73(2): 261-8.
- Whalley JM, Robertson GR, Scott NA, Hudson GC, Bell CW, Woodworth LM.** Identification and nucleotide sequence of a gene in equine herpesvirus 1 analogous to the herpes simplex virus gene encoding the major envelope glycoprotein gB. J. Gen. Virol. 1989; 70: 383-394.
- Yasunaga S, Maeda K, Matsumura T, Kai K, Iwata H, Inoue T.** Diagnosis and seroepizootology of equine herpesvirus type1 and type 4 infection in Japan using a type specific ELISA. J Vet Med Sci. 1998; 10: 1133-1137.
- Yildirim Y, Yilmaz V, Kirmizigul AH.** Equine herpes virus type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) infections in horses and donkeys in northeastern Turkey. IJVR, 2015; 16 (4): 341-344



## Reproductive Performance, Milk Yield Parameters, and Some Postpartum Diseases That Are Associated with Clinical And Subclinical Ketosis in Dairy Cows

Ahmet Özer CAMBAZ<sup>1</sup>, Gökhan BOZKURT<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Health Sciences, Department of Veterinary Obstetrics and Gynecology, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, Türkiye

<sup>2\*</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, Türkiye

### ABSTRACT

Negative energy balance (NEB) is a physiological state that arises during the transition from pregnancy to lactation in dairy cows. This transition period is associated with a decline in dry matter intake and an increased demand for energy sources for milk production. Ketosis, a metabolic disorder, often emerges shortly after calving and is characterized by reduced glucose levels, depleted liver glycogen, and elevated ketone body concentrations. The study aimed to investigate the impacts of ketosis on milk yield, reproductive parameters, and postpartum metabolic diseases in cows with subclinical and clinical ketosis. The study involved 267 healthy pregnant Holstein dairy cows in the second and third lactation periods. Groups were formed based on postpartum third-day beta-hydroxybutyric acid (BHBA) levels. The groups included control (BHBA < 1.2 mmol/dL; n=101), subclinical ketosis (BHBA = 1.2-2.4 mmol/dL; n=90), and clinical ketosis (BHBA > 2.4 mmol/dL; n=76) groups. Results indicated that higher body condition scores (BCS) during calving were associated with an increased risk of postpartum ketosis (p<0.001). Subclinical ketosis led to a higher number of inseminations per pregnancy (p<0.01), extended service periods (p<0.001), and decreased pregnancy rates at first insemination (p>0.05). It was observed that the clinical ketosis group had a longer time to reach peak milk yield (p<0.001) and a higher peak milk yield (p<0.01). The incidence of septic metritis was found to be higher in cows with clinical ketosis (p<0.01). Consequently, the study revealed that ketosis has negative effects on reproductive parameters and the incidence of metabolic diseases. Additionally, the importance of BCS in assessing and managing the risk of ketosis in dairy cows during the transition period was emphasized. It is believed that further evaluation of the study with more animal material and additional parameters could yield more meaningful results.

**Key Words:** cattle, feeding, mastitis, metritis negative energy balance

\*\*\*

### Sütçü Sığırlarda Klinik ve Subklinik Ketozis ile İlişkili Üreme Performansı, Süt Verim Parametreleri ve Bazı Postpartum Hastalıklar

ÖZ

Negatif enerji dengesi (NED), süt sığırlarında gebelikten laktasyona geçiş sırasında ortaya çıkan fizyolojik bir durumdur. Bu geçiş dönemi, kuru madde alımındaki azalma ve süt üretimi için artan enerji ihtiyacı ile ilişkilidir. Ketozis, sıklıkla doğumdan hemen sonra ortaya çıkan bir metabolik bozukluktur ve düşük glukoz seviyeleri, azalmış karaciğer glikojeni ve artan keton cisimcikleri konsantrasyonları ile karakterizedir. Bu çalışma, subklinik ve klinik ketozise sahip ineklerde ketozisin süt verimine, üreme parametrelerine ve postpartum metabolik hastalıklara etkilerini araştırmayı amaçlamıştır. Çalışma, ikinci ve üçüncü laktasyon dönemlerindeki 267 sağlıklı, gebe Holstein ineklerini kapsamaktadır. Gruplar, doğum sonrası üçüncü gün beta-hidroksiyaütirik asit (BHBA) seviyelerine göre oluşturuldu. Gruplar, kontrol (BHBA < 1.2 mmol/dL; n=101), subklinik ketozis (BHBA = 1.2-2.4 mmol/dL; n=90) ve klinik ketozis (BHBA > 2.4 mmol/dL; n=76) gruplarından oluşmaktadır. Sonuçlar, doğum sırasında daha yüksek vücut kondisyon skorlarının (VKS) doğum sonrası ketozis riski ile ilişkilendirildiğini göstermiştir (p<0.001). Subklinik ketozis, gebelik başına daha fazla tohumlama (p<0.01), servis periyodunun uzaması (p<0.001) ve ilk tohumlama gebelik oranlarında düşüşe (p>0.05) yol açmıştır. Klinik ketozis grubunun pik süt verimine ulaşma süresinin daha uzun olduğu (p<0.001) ve daha yüksek pik süt verimine (p<0.01) sahip olduğu görüldü. Klinik ketozis olan ineklerde septik metritis insidansının (p<0.01) daha yüksek olduğu tespit edildi. Sonuç olarak, çalışmada ketozisin, üreme parametreleri ve metabolik hastalık insidansı üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğunu görüldü. Ayrıca, süt sığırlarının geçiş döneminde ketozis riskini değerlendirmede ve yönetmede VKS'nin önemi vurgulandı. Çalışmanın daha fazla hayvan materyali ve daha fazla parametre ile değerlendirmesinin daha anlamlı sonuçlar verebileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** sığır, besleme, mastitis, metritis, negatif enerji dengesi

To cite this article: Cambaz AÖ, Bozkurt G. Reproductive Performance, Milk Yield Parameters, and Some Postpartum Diseases That Are Associated with Clinical And Subclinical Ketosis in Dairy Cows. Kocatepe Vet J. (2023):16(4):588-596

Submission: 14.09.2023 Accepted: 11.12.2023 Published Online: 14.12.2023

ORCID ID: AÖC: 0009-0007-9002-9825, GB: 0000-0003-1837-4492

\*Corresponding author e-mail: gbozkurt@mehmetakif.edu.tr

## INTRODUCTION

Negative energy balance (NEB) is a physiological condition that occurs during the transition from pregnancy to lactation in dairy cattle. Dry matter consumption decreases by more than 30% in the last 3 weeks of pregnancy (Hayirli et al., 2002). The transition from late pregnancy to early lactation is a risky period for dairy cattle, during which many infectious and metabolic diseases can occur (Compton et al., 2014; Ingvartsen et al., 2003). During this period, the demand for energy sources such as glucose, amino acids, and fatty acids for milk production is 2-5 times higher than the pre-calving period requirements (Bell, 1995). Cows are in NEB when the energy from the diet cannot provide enough energy for high milk production (Grummer, 1995).

Ketosis is a metabolic disease in cattle that often begins in the first few days after birth and seriously affects animals for up to 2 weeks (Suthar et al., 2013). NEB is characterized by decreased glucose levels, reduced liver glycogen stores, fatty degeneration in the liver, and an increased concentration of ketone bodies in the blood, urine, milk, and respiratory air (Bremmer, 2002). Ruminants are susceptible to ketosis, and this susceptibility can be exacerbated in cows due to their increased glucose requirement (Drackley et al., 2001). From the start of the lactation period, until the cow reaches peak milk yield, there is a physiological loss in the cow's body condition. This loss is accompanied by an increase in beta-hydroxybutyric acid (BHBA) levels (Le Blanc, 2010). Ketosis is classified in different ways and the one of classification is related to BHBA concentrations. It is classified as subclinical and clinical ketosis, depending on the level of BHBA in the blood and the presence or absence of clinical signs of disease. Subclinical ketosis is defined as an increase in ketone bodies in the blood. The obvious finding of the disease is the presence of ketone bodies in the blood, urine, or milk. The serum BHBA values (1200-1400  $\mu\text{mol/L}$ ) are generally used for the diagnosis of subclinical ketosis (Suthar et al., 2013). Clinical ketosis is characterized by the presence of clinical symptoms such as hyperketonemia, hypoglycemia and decreased appetite, weight loss, and decreased milk yield. Clinical ketosis is usually determined at higher BHBA concentrations in the blood (Gordon et al., 2013).

This study aimed to determine the potential adverse effects of disease-related ketosis on some milk yield and reproductive parameters and the incidence of postpartum metabolic diseases in cows with subclinical and clinical ketosis.

## MATERIALS AND METHODS

### Animal Material and Feeding Management

The study includes a total of 267 pregnant Holstein dairy cows in their second and third lactation periods. The animals had an average weight of  $746 \pm 71$  kg, and their average daily milk yields ranged from 38 to 40 L. Throughout the lactation period, the cows' milk yield was recorded as 11,000-12,000 kg. The animals are grouped based on the number of milking days, reproductive statuses, and milk yields. The cows are milked three times a day. The animals included in the study were fed two different rations during the dry period. These rations were the far-off dry period ration consumed from 39-60 days before calving and the close-up dry period ration consumed before calving. The animals had ad libitum feeding. The compositions of the late dry and close dry period rations are presented in Table 1. Following calving, two different rations were used during the early lactation (days 1-21) and mid-late lactation (days 22-305) periods (Table 2).

### Study Groups

The study consisted of three different groups; control (BHBA < 1.2 mmol/dL; n=101), subclinical ketosis (BHBA = 1.2-2.4 mmol/dL; n=90), and clinical ketosis (BHBA > 2.4 mmol/dL; n=76). The body temperatures of the animals included in the study groups were monitored for the first 3 days after calving. During this period, cows with diseases such as mastitis or retained placenta were not included in the groups. All the animals in the study were in second and third lactation periods.

### Determination of BHBA Levels and Body Condition Scores

Blood samples were collected from the jugular vein from the all animals. Blood BHBA levels were measured on postpartum days 3, 7, and 21. In the formation of groups, postpartum 3rd day BHBA levels were taken as criteria (Suthar et al., 2013). The measurements of BHBA levels were conducted using Centrivet GK blood ketone strips rapid test kit (mmol/dL Catalog No: 1150872301). The determination of body condition scores (BCS) in the study groups was done considering the same days (55 days before calving – dry period and 73 days after calving – first insemination time). The method of Wildman et al. (1982) was used as a reference for BCS determination.

### Treatment

No treatment was administered to cows in the subclinical ketosis group. However, cows showing clinical ketosis (BHBA > 2.4 mmol/dL) based on the BHBA result obtained on the 7th day were recorded and excluded from the study, and treatment was applied. Cows in the clinical ketosis group were

subjected to a ketosis treatment protocol. For this purpose, intravenous administration of 500-1000 cc of 30% dextrose (DekstroVIP®, % 30, Polifarma) and glucocorticoid (Devamed®, Topkim) were applied (Gordon et al., 2013). Animals that did not recover and had mixed infections were removed from the groups and transferred to the routine management treatment protocol.

### **Synchronization Protocol and Pregnancy Examination**

A voluntary waiting period of 73 days was determined on the farm. During this period, no artificial insemination was applied to the animals. The synchronization protocol started on postpartum days 53-55. The double-ovsynch synchronization protocol was applied. For synchronization, 0.075 mg of cloprostenol (Dalmazin®, Fatro-Güneşli A.Ş.) and 0.0262 mg/ml of Lecirelin (Dalmarelin®, Fatro-Güneşli A.Ş.) were used. The first pregnancy examination for all study groups was conducted through ultrasonography (Hasvet 838, Türkiye) on days 34±3 after insemination. The second pregnancy examination was performed on days 63±3 of pregnancy.

### **Reproductive and Milk Yield Parameters**

The number of inseminations per pregnancy, service period, and conception rate in the first insemination were recorded in the herd management program (Delpro™, Unided Kingdom). The 305-day milk yield, time to reach peak milk yield and peak milk yield of cows in the study group were recorded. Data collection was carried out through a parallel milking system (DeLaval) during milking and obtained based on three milkings per day from the program.

### **Detection of Postpartum Diseases**

Postpartum routine controls were conducted every morning during milking (mammary and milk examination). During the controls, body temperature, fecal examination, and lochia discharge were evaluated. Additionally, feed consumption and rumination were observed. Suspected animals were brought to the clinic for treatments and diagnoses were confirmed. Left displaced abomasum (LDA) was determined by abdominal ping sound with a stethoscope (Niehaus, 2008). Septic metritis was characterized by vaginal examination revealing dark-colored, malodorous discharge ranging from dark brown to reddish, containing small fetal membranes (Azawi, 2008). Hypocalcemia was diagnosed through clinical examination (Quader et al., 2017). Similarly, animals diagnosed with mastitis through clinical examination, mammary examination, and somatic cell count (California mastitis test) were recorded (Ruegg and Reinemann., 2002; Sargeant et al., 2001).

### **Statistical Analyses**

SPSS 25.0 software package was used for statistical analysis of the data in the study. A mixed model was constructed to examine the effect of ketosis on milk and reproductive parameters, considering the impact of body condition scores. The Bonferroni test was applied to assess the significance of the difference between groups. The chi-square test was used to determine the difference in the incidence rates of metabolic diseases among study groups. Statistical significance was accepted as  $p < 0.05$ . Results were presented as mean ± standard error.

### **Ethics Approval**

All procedures were approved by the Animal Ethics Committee (AEC) at Burdur Mehmet Akif University, Türkiye (No: 113/1147)

## **RESULTS**

### **BHBA Levels and Body Condition Score**

Mean BHBA levels were determined as  $0.84 \pm 0.07$  mmol/L in the control group,  $1.47 \pm 0.09$  mmol/L in the subclinical ketosis group, and  $3.15 \pm 0.54$  mmol/L in the clinical ketosis group on the postpartum 3rd day. Seventh and 21st day blood BHBA levels are shown in Table 3.

It was observed that the control group had a BCS of  $3.43 \pm 0.06$ , while the subclinical and clinical ketosis groups had BCS values of  $3.57 \pm 0.07$  and  $3.69 \pm 0.07$ , respectively ( $p < 0.001$ ). It was determined that the clinical ketosis group had the highest BCS during the dry period. The changes in BCS during the dry period and at the time of first insemination among the study groups are shown in Table 4.

### **Some Reproductive Parameters**

The number of inseminations per pregnancy was determined as  $2.47 \pm 1.22$  for the control group,  $3.43 \pm 1.22$  for the subclinical ketosis group, and  $2.99 \pm 1.23$  for the clinical ketosis group. A statistically significant difference was found among the groups, with the subclinical ketosis group having a higher number of inseminations per pregnancy compared to the other groups ( $p < 0.01$ ). When evaluated in terms of the service period, the values for the control, subclinical, and ketosis groups were determined as  $124.77 \pm 7.56$ ,  $160.51 \pm 8.01$ , and  $176.76 \pm 9.35$  days, respectively. A shortened service period was observed in the control group ( $p < 0.001$ ). In the study, it was determined that 39.6% of the cows in the control group, and 27.78% and 37.88% of the cows in the subclinical and clinical ketosis groups, respectively, became pregnant at the first insemination (Table 5). There was no statistically significant difference among the groups in terms of pregnancy rate at the first insemination ( $p > 0.05$ ).

### **Milk Yield Parameters**

The time to reach peak milk yield was found to be  $60.04 \pm 2.66$  days for the control group,  $67.88 \pm 2.76$

days for the subclinical ketosis group, and  $82.41 \pm 3.09$  days for the clinical ketosis group. There was a statistically significant difference among the groups, indicating that healthy cows reached peak milk yield more quickly, while cows in the ketosis group took longer to reach it ( $p < 0.001$ ). In terms of peak milk yield, the averages for the control, subclinical, and clinical ketosis groups were determined as  $57.44 \pm 1.77$ ,  $58.17 \pm 1.78$ , and  $60.79 \pm 1.83$  liters, respectively. The difference among the groups was statistically significant, with the highest peak milk yield observed in the clinical ketosis group ( $p < 0.01$ ). There was no statistically significant difference among the study groups in terms of the 305-day milk yield averages ( $p > 0.05$ ). Milk yield parameters based on groups are presented in Table 6.

### The Rates of Some Diseases

The rates of septic metritis in the control, subclinical ketosis, and clinical ketosis groups were found to be 5.94%, 11.11%, and 25.76%, respectively. It was observed that the rates of septic metritis were higher in cows with clinical ketosis ( $p < 0.01$ ). The incidence of hypocalcemia was 0.99% in the control group, 1.11% in the subclinical ketosis group, and 4.55% in the clinical ketosis group. There was no significant difference in the frequency of hypocalcemia among the study groups ( $p > 0.05$ ). The rates of LDA were 2.97% in the control group, 10% in the subclinical ketosis group, and 13.64% in the clinical ketosis group. It was determined that the rate of LDA was lower in the control group compared to the other groups ( $p < 0.05$ ). The proportions of cows with septic metritis, clinical hypocalcemia, mastitis, and LDA based on the study groups are shown in Table 7.

**Table 1.** The ration of dry period

<b>Ration</b>	<b>Far of Dry Period (kg/cow)</b>	<b>Close up Dry Period (kg/cow)</b>
Alfalfa Hay	1.00	0
Wheat Straw	8.00	5.00
Corn Silage	13.00	8.00
Grass Silage	3.75	4.75
Canola Meal	1.90	1.80
Premix	0.01	0.02
Zeolite	0.02	0.02
Urea	0.07	0
Marble Dust	0.25	0.32
Magnesium Oxide	0.04	0.03
Dicalcium Phosphate (DCP)	0.10	0
Ammonium Chloride	0	0.25
High Moisture Corn	0	3.90
Orange Pulp	0	2.00
<b>Calculated Nutrient Values</b>	<b>Values</b>	<b>Values</b>
Crude Protein, %	11.57	12.90
Dry Matter Intake, kg/day	15.72	12.75
Roughage Ratio in Diet, %	88.66	100
Concentrate Ratio in Diet, %	11.34	0
Soluble Protein, %	5.67	7.83
Soluble Crude Fiber, %	9.25	4.43
Neutral Detergent Fiber (NDF), %	53.58	44.90
Non-Fiber Carbohydrates (NFC), %	25.81	31.23
Sugar, %	3.02	2.50
Starch, %	9.83	20.53
Calcium (Ca), %	1.19	0.99
Phosphorus (P), %	0.30	0.32

Magnesium (Mg), %	0.51	0.42
Sodium (Na), %	0.09	0.07
Chloride (Cl), %	0.54	1.53
Dietary Cation-Anion Difference (DCAD), mEq/100g	16.8	19.50

**Table 2.** The ration of lactation period

<b>Ration</b>	<b>Early Lactation (kg/cow)</b>	<b>Mid and late lactation (kg/cow)</b>
Alfalfa Hay	5.00	4.60
Cottonseed	1.45	1.50
Cracked Corn	1.00	1.15
Soybean Meal	0.75	1.00
Corn Gluten Meal	0.60	0.85
Sodium Bicarbonate	0.35	0.40
Bypass Fat	0.45	0.35
Canola Meal	1.25	1.70
Premix	0.35	0.35
Marble Dust	0.30	-
High-Moisture Corn	3.50	7.00
Corn Silage	13.25	29.50
Corn Distillers Dried Grains with Solubles (DDGS)	-	0.80
Potato Pulp	-	2.00
Orange Pulp	-	4.00
Water	3.50	4.00
Molasses	0.60	0.50
<b>Calculated Nutrient Values</b>	<b>Values</b>	<b>Values</b>
Dry Matter Intake kg/day	17.89	27.03
Crude Protein %	17.35	16.25
Soluble Protein %	8.40	7.60
NDF (Neutral Detergent Fiber) %	29.49	27.53
ADF (Acid Detergent Fiber) %	21.21	18.6
Sugar %	5.33	4.50
Starch %	21.25	27.75
NFC (Non-Fiber Carbohydrate) %	38.96	45.02
Soluble Fiber %	8.98	8.74
Fat %	5.57	4.92
NEL (Net Energy for Lactation), Mcal/kg	1.97	1.66
Calcium %	1.07	0.48
Phosphorus %	0.39	0.36
Magnesium %	0.52	0.38
Sodium %	0.71	0.52
Chlorine %	0.47	0.37
DCAD (Dietary Cation-Anion Difference) mEq/100g	41.75	26.03

**Table 3.** BHBA levels according to days (mmol/L)

	Control	Subclinical ketosis	Clinical ketosis
3 <sup>rd</sup> day	0.84±0.07	1.47±0.09	3.15±0.54
7 <sup>th</sup> day	0.82±0.01	1.01±0.25	1.27±0.14
21 <sup>st</sup> day	0.85±0.05	0.88±0.04	0.96±0.09

**Table 4.** Body condition scores according to groups

	Control	Subclinical ketosis	Clinical ketosis	<i>P value</i>
Dry period	3.43±0.06 <sup>c</sup>	3.57±0.07 <sup>b</sup>	3.69±0.07 <sup>a</sup>	***
First insemination	2.90±0.06	2.87±0.06	2.85±0.06	-
Difference	0.53±0.07 <sup>c</sup>	0.71±0.08 <sup>b</sup>	0.84±0.08 <sup>a</sup>	***

a, b, c: There is a statistically significant difference between different letters on the same row.  
 \*\*\*: (p<0.001).

**Table 5.** Some reproductive parameters

	Control	Subclinical ketosis	Clinical ketosis	<i>P value</i>
NOIP	2.47±1.22 <sup>b</sup>	3.43±1.22 <sup>a</sup>	2.99±1.23 <sup>ab</sup>	**
SP (day)	124.77±7.56 <sup>b</sup>	160.51±8.01 <sup>a</sup>	176.76±9.35 <sup>a</sup>	***
FSCR (%)	39.60	27.78	37.88	-

NOIP: Number of inseminations per pregnancy SP: Service period FSCR: First-service conception rate

a, b, c: There is a statistically significant difference between different letters on the same row

\*\* : p<0,01; \*\*\* p<0,001

**Table 6.** Some milk yield parameters

	Control	Subclinical ketosis	Clinical ketosis	<i>P value</i>
TPMY (day)	60.04±2.66 <sup>c</sup>	67.88±2.76 <sup>b</sup>	82.41±3.09 <sup>a</sup>	***
PMY (Liter)	57.44±1.77 <sup>b</sup>	58.17±1.78 <sup>b</sup>	60.79±1.83 <sup>a</sup>	**
LMY (Liter)	12772.27±602.6	13104.76±605.53	12686.36±616.12	-

TPMY: Time to peak milk yield PMY: Peak milk yield LMY: Lactation milk yield

a, b, c: There is a statistically significant difference between different letters on the same row

\*\* : p<0,01; \*\*\* p<0,001

**Table 7.** Incidence of some postpartum diseases according to groups (%)

	Control	Subclinical ketosis	Clinical ketosis	<i>P</i> value
<b>Septic metritis</b>	5.94 <sup>b</sup>	11.11 <sup>b</sup>	25.76 <sup>a</sup>	<b>**</b>
<b>Clinical Hypocalcemia</b>	0.90	1.11	4.55	-
<b>Mastitis (10-30 days)</b>	3.55 <sup>b</sup>	4.86 <sup>ab</sup>	6.14 <sup>a</sup>	<b>*</b>
<b>LDA</b>	2.97 <sup>b</sup>	10.00 <sup>a</sup>	13.64 <sup>a</sup>	<b>*</b>

LDA: Left displaced abomasum

a, b, c: There is a statistically significant difference between different letters on the same row

\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

## DISCUSSION

Ketosis is one of the most important metabolic diseases with a high prevalence in dairy cattle. Its prevalence was evaluated between DIM 2-21 days in studies conducted in different countries and different incidences were determined for subclinical ketosis and clinical ketosis (Lei and Simoes., 2021). Suthar et al. (2013) observed that the average prevalence of subclinical ketosis (BHBA  $\geq 1.2$  mmol/L) within ten European countries was 21.8% (ranging between 11.2 and 36.6%) between the 2nd and 15th day of lactation. In this respect, cattle with ketosis should be rapidly identified and treated.

Ketosis is directly related to BCS. Gillund et al. (2001) investigated the likelihood of ketosis between cows with a BCS  $\geq 3.5$  or higher and cows with a BCS score of 3.25 or lower during calving on 732 dairy cows. According to the obtained results, cows with a BCS  $\geq 3.5$  during calving were approximately 2.5 times more likely to develop ketosis compared to cows with a BCS score of 3.25 or lower. Additionally, cows experiencing significant BCS losses in the postpartum period were determined to have only half the probability of conceiving at the first insemination compared to cows with moderate BCS losses. Schrijver (2018) indicated that cows with high body condition scores during the dry period have a higher risk of elevated BHBA concentrations and developing ketosis in the postpartum period. Cows entering the dry period with high BCS were found to experience greater body condition losses in the first 8 weeks. Singh and Bhakat (2022) found in their study that overfed cows during the dry period became excessively conditioned at calving and experienced more severe NEB during the transition period. The presented study findings are consistent with previous reports. The current study demonstrates that cows with high BCS during calving are at a higher risk of postpartum ketosis. Cows with high body condition scores, when faced with increased energy requirements postpartum, start utilizing their energy reserves. This situation can contribute to the

development of ketosis by causing energy imbalance and accumulation of ketone bodies. Furthermore, the fact that ketosis groups are the ones with more severe BCS loss in the study supports this statement.

Ketosis results from the occurrence of an energy deficit due to severe NEB, negatively affecting certain reproductive performance parameters. Numerous studies have shown a relationship between reproductive traits, including the time from NEB to first luteal activity, the first conception interval, the time from calving to first ovulation, and the time from calving to conception (Gillund et al., 2001; Walsh et al., 2007). Duffield (2000) stated that cows with subclinical ketosis performed more insemination per pregnancy. Suthar et al. (2013) reported that BHBA concentrations exceeding thresholds of 1.1 and 1.6 mmol/L during the first 2 weeks postpartum reduced pregnancy probability. Additionally, it was found that the number of inseminations per pregnancy increased ketosis in Holstein cows with ketosis (Mellado et al., 2018). Raboisson et al. (2014) reported that both clinical and subclinical ketosis extended the first estrus interval and led to decreased pregnancy rates. In the current study, a statistically significant difference was observed in terms of number of inseminations per pregnancy between the control group and the subclinical ketosis group ( $p < 0.001$ ). Conversely, such a difference was not found between the clinical ketosis and control groups. However, when evaluated proportionally, similarly to other studies, the number of inseminations per pregnancy increased by approximately 29% and 13% in the subclinical and clinical ketosis groups, respectively. The higher number of inseminations per pregnancy in the subclinical ketosis group may be attributed to the direct treatment of animals with the clinical form. Allowing animals in the subclinical ketosis group to undergo their physiological process may have an effect in this regard. Furthermore, as consistent with other studies, the pregnancy rate at first insemination decreased and the service period ( $P < 0.001$ ) extended in these animals. The extended service period in the current study may be due to the

disruption of the initial ovulation process at the start of lactation due to increased NEB in cows. Another reason for the longer service period duration on the farm compared to the reviewed literature could be the higher average milk yield on this farm (Gorelik et al., 2021; Sehested et al., 2009)

The relationship between milk yield and ketosis generally varies according to the lactation period and parity (Ospina et al., 2010). Duffield et al. (2009) reported in their study on 1010 dairy cows that cows with subclinical ketosis during the postpartum period experienced a daily milk yield loss of 1.88 kg, whereas cows with clinical ketosis had a loss of 3.3 kg. Ospina et al. (2010) reported a reduction of 358 kg in the 305-day milk yield. McArt et al. (2012) stated that cows with a BHBA value of 1.2 mmol/L experienced a 0.5 L reduction in daily milk yield for every 0.1 mmol/L increase in BHBA on the 30th day postpartum. In this study, multiparous cows in their 2nd and 3rd lactation were used, and no differences were found among the groups in terms of the 305-day milk yield. The generally higher milk yield in cows with ketosis could contribute to greater increases in peak milk yield. The increase in milk yield at the beginning of the postpartum period and subsequently in peak yield might lead to higher fat mobilization and hence an increased risk of ketosis. Furthermore, since ketosis generally decreases after a maximum of 2 weeks, it can be among the reasons that the peak milk yield of high-yielding cows might not be significantly affected once peak production is achieved. Additionally, based on the results of this study, the extension of peak day duration due to NEB might lead to an increased peak milk yield in cows with ketosis.

Various studies indicate a relationship between ketosis and various diseases. The findings from these studies suggest that ketosis may be associated with LDA, metritis, and other diseases, which can have negative effects on reproductive efficiency (LeBlanc et al., 2005; Suthar et al., 2013; Seifi et al., 2011). Ospina et al. (2010), observed that there was a 1.8% increase in the incidence of LDA in animals with BHBA levels  $\geq 1.2$  mg/dL. Furthermore, LeBlanc et al. (2005), it was seen that cows with serum BHBA levels  $\geq 1200$   $\mu\text{mol/L}$  had a higher risk of LDA. These findings indicate a relationship between ketosis and the development of LDA. Cows with BHBA levels exceeding 1.2 to 1.4 mmol/L during the first 2 weeks postpartum were found to have higher likelihood of developing LDA compared to the control group (Suthar et al., 2013). Seifi et al. (2011) reported a higher risk of LDA in cows with ketosis in a weekly follow-up of 849 cows from 16 farms after calving. Similar results were obtained in the current study. Suthar et al. (2013) also noted in a study that subclinical ketosis was associated with metritis. Ospina et al. (2010) found an increased incidence of metritis in animals with BHBA levels  $\geq 1.2$  mg/dL. Similar results were obtained in the current study.

Ketosis increases the risk of septic metritis. In cows with ketosis, the increase in NEB levels can lead to immune deficiencies due to lymphocyte dysfunction (Schulz et al., 2015), which in turn can contribute to increased disease incidences.

## CONCLUSION

In conclusion, it has been determined that both subclinical and clinical ketosis can lead to reproductive issues, potential problems in milk yield parameters, and associations with other metabolic diseases. This situation may also contribute to an increased frequency of metabolic disorders. This study has concluded that subclinical and clinical ketosis can lead to various negative effects. Furthermore, it emphasizes the importance of body condition score as a significant parameter in assessing and managing the risk of ketosis.

**Conflict of Interest:** The authors have no conflicts of interest to report.

**Authors' Contributions:** AOC and GB contributed to the project idea, design and execution of the study. All authors have write, read, and approved the finalized manuscript.

**Ethical Approval:** This research was approved by Animal Ethics Committee (AEC) at Burdur Mehmet Akif University (Ref No: 113/1147)

**Acknowledgement:** This study was summarised by the first author's high graduate thesis.

**Explanation:** None.

## REFERENCES

- Azawi, O. I. (2008). Postpartum uterine infection in cattle. *Animal Reproduction Science*, 105(3-4), 187-208.
- Bell, A. W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, 73(9), 2804-2819.
- Bremmer, D. (2002, January). Monitoring subclinical ketosis in transition dairy cows. *Minnesota Dairy Health Conference*.
- Compton, C. W. R., McDougall, S., Young, L., & Bryan, M. A. (2014). Prevalence of subclinical ketosis in mainly pasture-grazed dairy cows in New Zealand in early lactation. *New Zealand Veterinary Journal*, 62(1), 30-37.
- Drackley, J. K. (2008). Steady as she goes: rethinking dry cow nutrition. In *Mid-South Ruminant Nutrition Conference* (pp. 9-16).
- Drackley, J. K., Overton, T. R., & Douglas, G. N. (2001). Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*, 84, E100-E112.



- Duffield, T. (2000). Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Veterinary clinics of north America Food Animal Practice*, 16(2), 231-253.
- Duffield, T. F., Lissemore, K. D., McBride, B. W., & Leslie, K. E. (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science*, 92(2), 571-580.
- Gillund, P., Reksen, O., Gröhn, Y. T., & Karlberg, K. (2001). Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84(6), 1390-1396.
- Gordon, J. L., LeBlanc, S. J., & Duffield, T. F. (2013). Ketosis treatment in lactating dairy cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 29(2), 433-445.
- Gorelik, O. V., Harlap, S. Y., Vinogradova, N. D., Lykasova, I. A., & Belookova, O. V. (2021). Evaluation of the relationship between milk yield and the service period duration of cows. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 677, 3, 032019.
- Grummer, R. R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*, 73(9), 2820-2833.
- Hayirli, A., Grummer, R. R., Nordheim, E. V., & Crump, P. M. (2002). Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 85(12), 3430-3443.
- Ingvartsen, K. L., Dewhurst, R. J., & Friggens, N. C. (2003). On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science*, 83(2-3), 277-308.
- LeBlanc, S. (2010). Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development*, 56(S), S29-S35.
- LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., & Duffield, T. F. (2005). Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 88(1), 159-170.
- Lei, M. A. C., & Simões, J. (2021). Invited review: ketosis diagnosis and monitoring in high-producing dairy cows. *Dairy*, 2(2), 303-325.
- McArt, J. A. A., Nydam, D. V., & Oetzel, G. R. (2012). Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 5056-5066.
- Mellado, M., García, J. E., Véliz Deras, F. G., de Santiago, M. D. L. Á., Mellado, J., Gaytán, L. R., & Ángel-García, O. (2018). The effects of periparturient events, mastitis, lameness and ketosis on reproductive performance of Holstein cows in a hot environment. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 50(1), 1-8.
- Nebel, R. L., & McGilliard, M. L. (1993). Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 76(10), 3257-3268.
- Niehaus, A. J. (2008). Surgery of the abomasum. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(2), 349-358.
- Ospina, P. A., Nydam, D. V., Stokol, T., & Overton, T. R. (2010). Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3595-3601.
- Quader, N., Islam, K. M. F., Jalal, S., Kumar, S., Hossain, I., Shawn, A., & Hoque, M. (2017). Investigation of clinical hypocalcaemia in cattle and goats at the selected veterinary hospitals in Bangladesh and India. *Journal of Dairy Veterinary Animal Research*, 5(1), 33-36.
- Ruegg P.L., & Reinemann D.J. (2002). Milk quality and mastitis tests. *Bovine Practice*, 36, 41-54.
- Sehested, J., Gaillard, C., Lehmann, J. O., Maciel, G. M., Vestergaard, M., Weisbjerg, M. R., & Kristensen, T. (2019). Extended lactation in dairy cattle. *Animal*, 13(S1), 65-74.
- Sargeant, J. M., Leslie, K. E., Shirley, J. E., Pulkrabek, B. J., & Lim, G. H. (2001). Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 84(9), 2018-2024.
- Schrijver, D. (2018). Ketosis in relation to body condition score change and behaviour (Master's thesis).
- Schulz, K., Frahm, J., Kersten, S., Meyer, U., Reiche, D., Sauerwein, H., & Dänicke, S. (2015). Effects of elevated parameters of subclinical ketosis on the immune system of dairy cows: in vivo and in vitro results. *Archives of Animal Nutrition*, 69(2), 113-127.
- Seifi, H. A., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., & Duffield, T. F. (2011). Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, 188(2), 216-220.
- Singh, A. K., & Bhakat, C. (2022). The relationship between body condition score and milk production, udder health and reduced negative energy balance during initial lactation period: A review. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 12(1), 1-9.
- Suthar, V. S., Canelas-Raposo, J., Deniz, A., & Heuwieser, W. (2013). Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 2925-2938.
- Walsh, R. B., Walton, J. S., Kelton, D. F., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., & Duffield, T. F. (2007). The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2788-2796.
- Wildman, E. E., Jones, G. M., Wagner, P. E., Boman, R. L., Troutt Jr, H. F., & Lesch, T. N. (1982). A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science*, 65(3), 495-501.

## Effects of Supplementation of Boron and Vitamin C on Lipid and Hematological Parameters in Rats

Bestami Kemal GÜMÜŞAY<sup>1</sup>, Abdullah ERYAVUZ<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Ministry of Agriculture and Forestry, Hatay Provincial Directorate of Agriculture and Forestry, Hatay, Türkiye

<sup>2</sup>Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University 03200, Afyonkarahisar, Türkiye

### ABSTRACT

The aim of this study is to determine the effects of the co-administration of boron (B) and vitamin C on blood triglyceride, cholesterol, HDL and LDL levels and hematological parameters. In the study, four study groups created with 32 Wistar Albino male rats weighing 250-300 g. The experimental groups were shaped as Control, Boron, Vitamin C and Vitamin C + Boron. Vitamin C and boron were administered 200 mg.kg.<sup>-1</sup> of vitamin C orally, and boron at an amount of 5 mg.kg.<sup>-1</sup> intraperitoneally, respectively in the rats of the Vitamin C and Boron groups. The rats in the Vitamin C+Boron group were given at 200 mg.kg.<sup>-1</sup> of vitamin C orally, and 5 mg.kg.<sup>-1</sup> of boron intraperitoneally. At the end of the trial, which was for total of 35 days, triglyceride, cholesterol, HDL and LDL levels and hematological parameters were measured in blood samples taken from the heart under anesthesia. It observed that the applications of vitamin C and boron had no effects on the plasma levels of triglycerides, cholesterol, HDL and LDL. Both vitamin C and boron applications had no effect on the erythrocyte count, hematocrit value and hemoglobin levels, however the combination of vitamin C and boron supplementation decreased the leukocyte count, and there was an increase on the platelet count. In conclusion, the combination of vitamin C and boron with antioxidant properties did not change plasma lipid levels, but it affected blood leukocyte and platelet counts.

**Keywords:** Boron,, HDL, Hematological parameters, Rat, Vitamin C

\*\*\*

## Sıçanlarda Bor ve Vitamin C Takviyesinin Hematolojik ve Lipid Parametrelerine Etkileri

### ÖZ

Bu çalışmanın amacı, bor (B) ve vitamin C'nin birlikte uygulanmasının kandaki trigliserit, kolesterol, HDL ve LDL'nin seviyeleri ile hematolojik parametrelerine etkisini belirlemektir. Çalışmada, 32 adet 250-300 gr ağırlığında Wistar Albino cinsi erkek sıçan alınarak 4 adet çalışma grubu oluşturulmuştur. Çalışma grupları Kontrol, B, Vitamin C ve Vitamin C + B olarak şekillendi. Vitamin C ve B grubu sıçanlara sırasıyla 200 mg.kg.<sup>-1</sup> C vitamini oral, bor 5 mg.kg.<sup>-1</sup> intraperitoneal olarak verildi. Vitamin C+B grubundaki sıçanlara C vitamini oral yoldan 200 mg.kg.<sup>-1</sup>, intraperitoneal olarak 5 mg.kg.<sup>-1</sup> B verildi. Toplam 35 gün süren deneme sonunda anestezi altında kalpten alınan kan örneklerinde; trigliserid, kolesterol, HDL ve LDL düzeyleri ile hematolojik parametreler ölçüldü. Yapılan uygulamaların trigliserid, kolesterol, HDL ve LDL'nin seviyelerine etki etmediği tespit edildi. Hem vitamin C hem de B uygulamalarının eritrosit sayısı, hematokrit değer ve hemoglobin düzeylerine etkisinin olmadığı, vitamin C'nin B ile takviyesinin birlikte kullanılmasının lökosit sayısını düşürdüğü ve trombosit sayısını ise artırdığı bulundu. Sonuç olarak, antioksidan özelliklere sahip vitamin C ve B'un birlikte kullanılmaları serum lipid düzeylerini değiştirmediği ancak kan lökosit ve trombosit sayısını etkilediği gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Bor, HDL, Hematolojik Parametreler, Sıçan, Vitamin C.

To cite this article: Gümüüşay BK., Eryavuz Sıçanlarda Bor ve Vitamin C Takviyesinin Hematolojik ve Lipid Parametrelerine Etkileri. (2023) 16(4):597-605

Submission: 25.08.2023 Accepted: 13.12.2023 Published Online: 18.12.2023

ORCID ID; BKG: 0009-0007-9567-2529 AE: 0000-0001-8602-2400

\*Corresponding author e-mail: [eryavuz@aku.edu.tr](mailto:eryavuz@aku.edu.tr)

## GİRİŞ

Kanın yapısındaki değişimleri yansıtan parametreler insan ve hayvanların genel sağlık durumunu yansıtmaları nedeniyle rutin olarak incelenen değerleri oluşturmaktadır. Bu sayede beslenme ve patolojik bozukluklara bağlı olarak bu parametrelerin fizyolojik sınırlarda meydana gelen değişimler, organ ve dokuların fizyolojik mekanizmalarında yol açtıkları farklılıkları yansıtabilmektedir (Etim ve ark. 2014). Bu parametreler için insan ve farklı hayvan türlerine yönelik referans değerler elde edilmiş olması nedeniyle özellikle beslenmenin yol açtığı değişiklikler kolaylıkla izlenebilmektedir (Oyawoye ve Ogunkunle, 2004). Ayrıca, referans değerleri bilinen hematolojik ve biyokimyasal parametrelerin incelenmesi, gıda takviyesi olarak kullanılan maddelerin vücudun metabolik mekanizmalarında yol açtıkları değişimlerin tespit edilmesinde ve oluşturdukları yan etkilerin izlenmesinde de çok sık başvurulan yöntemi oluşturmaktadır. Bu sayede, kullanılan gıda takviyelerinin fizyolojik olaylarda rol oynayan mekanizmalardaki değişimlerin altında yatan nedenler açıklanabilmektedir.

İnsanlar ve hayvanlar günlük olarak su ve gıda alımı yoluyla bor (B) tüketebilmekte, ancak günlük alım seviyesi belirsizliğini korumaktadır. Günlük B alımı; bitkiler, hayvanlar ve insanlar için gerekli olmakla birlikte, bu elementin organizmada oluşturduğu biyolojik etkileri hakkındaki bilgiler hala sınırlıdır. Fizyolojik ve metabolik faaliyetlerde önemli rollere sahip olduğunun gösterilmesinden sonra (Biçâ ve ark. 2022), olumlu etkileri yanında B takviyesine bağlı çeşitli yan etkilerinin olup olmadığı da araştırılmaktadır. B takviyesinin kullanım sahası genişledikçe, B ile birlikte diğer ek gıda maddelerinin birlikte kullanımlarına bağlı yan etki ve komplikasyonlara ilişkin yapılacak çalışmalar, B takviyelerinin kullanımının yaygınlaştırılması bakımından önemli olacaktır.

B takviyelerinin; enzimatik aktiviteyi, steroid hormonlar ile kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) ve magnezyum ( $Mg^{+2}$ ) gibi diğer mikro besinlerin metabolizması ve aktivitesini etkilediği iyi belgelenmiştir (Bello ve ark. 2018). Bu nedenle, B takviyelerinin artrit, metabolik hastalıklar, merkezi sinir sistemi bozuklukları ve çeşitli bulaşıcı hastalıklar için terapötik araçlar olarak kullanılabilmesi ileri sürülmektedir (Kabu ve Akosman. 2013). B takviyesi yapılan yemle beslenen sığaların kanında vitamin C düzeylerinin arttığı gözlenmiş ancak altında yatan mekanizma açıklanmamıştır (İnce ve ark. 2010). Bu nedenle, vitamin C düzeyine etkisi olduğu bilinen B'la birlikte vitamin C uygulamasının hematolojik ve lipid parametrelerine olası etkilerinin ortaya konması önemli olmaktadır.

Kan, besinleri ve diğer maddeleri vücudun farklı bölgelerine taşıdığından, diyet alımı hayvanların kan bileşimini etkileyen ana faktör olarak kabul edilmiştir (Oyawoye ve Ogunkunle. 2004). Sonuç olarak, beslenme için tüketilen diyetin içeriği gibi kanı etkileyen her şey, bir insan ve hayvanın sağlığını kesinlikle etkileyecektir. Diyetle günlük alınması gereken maddelerden bazıları da mineral ve vitaminlerdir. Nitekim, Giannetto ve arkadaşları (2021); atlarda bor, nikel, arsenik ve antimona minerallerinin hematolojik parametreler gibi biyobelirteçlerle korelasyonunu değerlendirdikleri çalışmada, hematolojik parametreler üzerinde önemli bir etkiye neden olabilen ve kan biyobelirteçlerini temsil edebilecek tek elementin B olduğunu ileri sürmüşlerdir. Daha önce yapılan çalışmalarda bor (Durmuş ve ark. 2018; Kaya ve Macit 2020) ve vitamin C (Başgeçmez ve Eryavuz. 2021) takviyelerinin hematolojik ve biyokimyasal değerlere etkileri gösterilse de, bu katkı maddelerinin birlikte kullanımına bağlı şekillenen biyolojik etkiler günümüzde halen ortaya konulmamıştır. Bu nedenle,

çalışma, B ve vitamin C'nin birlikte kullanılmasının tek başına kullanılmalarına göre hematolojik ve lipid profilinde bir üstünlüğe ya da farklılığa yol açmadığının ortaya çıkartılması amacıyla yapıldı.

## MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada hayvan materyalini Kobay A.Ş.`den temin edilen 250-300 gr ağırlığında 32 adet yetişkin Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar oluşturdu. Çalışma boyunca hayvanlara yapılacak tüm müdahaleler Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Yerel Etik Kurulu tarafından bildirilen kurallara doğrultusunda 24.06.2020 tarihli toplantısında almış olduğu 2020/04.32 numaralı onay kararıyla gerçekleştirildi. Hayvanların bakımı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi. Sıçanların beslenmesinde standart sıçan yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi. Çalışmada kullanılacak Vitamin C, 0,9'luk izotonik sodyum klorür solüsyonu ile karıştırılıp içerisinde partikül kalmayacak şekilde çözdürüldükten sonra, gastrik gavaj ile oral olarak verildi. Verilme miktarları daha önce yapılan çalışmalar (Farombi ve ark. 2008) esas alınarak belirlendi. L (+) ascorbic acid (vitamin C) ticari müstahzarı şeklinde (Dasitgroup, Carlo ErbaReagents, Fransa) temin edildi. Yine çalışmada kullanılacak olan bor daha önce yapılan çalışmalarda (Ince ve ark. 2014) miktarlar referans alınarak belirlenmiştir. B kaynağı olarak serum fizyolojik (0,9'luk izotonik sodyum klorür) içinde çözdürülerek hazırlanan B 5 mg.kg.<sup>-1</sup> dozlarda intraperitoneal (i.p.) yolla uygulandı. Her iki ürün de 35 gün boyunca taze olarak hazırlanıp hayvanlara günlük olarak verildi. Kontrol grubuna ve deney gruplarına benzer stresi oluşturmak amacıyla %0,9'luk sodyum klorür hem gavaj hem de intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulandı.

Deneysel aşaması 35 gün olarak belirlenen çalışmada, hayvanlar 4 grup olacak şekilde rastgele seçildi. Çalışmada gruplara uygulanan yöntem ve deney grupları Tablo 1' de belirtildiği şekilde yapıldı.

Deneysel 35. gününde 10 mg ksilazin ve 80 mg ketamin ile anestezi altına alınmış hayvanlardan 3'er ml kalpten punksiyon yoluyla kan alınarak serum ayrıştırma tüplerine aktarıldı, alınan kan örneklerinin serumları soğutmalı santrifüjde (HettichUniversal 320 R) 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek ayrıştırıldı. Ayrıştırılan serumlar zaman kaybetmeden 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alınarak -80 C de biyokimyasal aşamaya kadar bekletildi. Hayvanlar ise cervical dislocation yöntemi ile (sıçanların boyun kısmı, servikal omurganın hızlı ve etkili bir şekilde kırılarak gerçekleştirilen ötenazi yöntemi) ötenazi edildi. Alınan kan örneklerinin Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan kan sayım cihazında (Mindray BC2800 VET, Çin) ölçümleri yapılarak; (Trig), (HDL), (LDL), (Kolesterol), (Hematolojik) değerleri belirlendi.

Çalışmanın örneklem büyüklüğü, ilgili gruplardaki hematolojik ve lipid profiline ait parametreler arasındaki farklılıklarının değerlendirileceği deneme deseninde tip 1 hata olasılığı ( $\alpha$ ) = 0,05, güç (1- $\beta$ ) = 0,80 kriterleri kullanılarak ve f (etki büyüklüğü) = 0,65 kabul edilmek üzere, toplamda minimum 32 erkek sıçanın çalışmada yer almasının uygun olacağı hesaplandı. Güç analizinin yapılmasında G\*Power Version 3.1.9.2 istatistik programından yararlanıldı. Elde edilen tüm değişkenler önemlilik testlerine geçilmeden önce parametrik test varsayımları açısından değerlendirildi. Normallik yönünden Shapiro Wilk testi ile, varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelendi. Parametrik test varsayımlarına uymayan değişkenlerden trigliserit, HDL ve HCT'nin gruplar arasındaki farklılıklarının değerlendirilmesi Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. Kalan değişkenler parametrik test varsayımlarına uyduğu için, gruplar arası

farklılıklarının istatistiksel açıdan kontrolü tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arası farklılığın anlamlı bulunduğu değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testi'nden

yararlanıldı. Değişkenler "ortalama  $\pm$  standart hata" olarak sunuldu. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0,05$  kabul edildi. Tüm istatistiksel analizlerde IBM SPSS 28 istatistik paket programından yararlanıldı.

**Tablo 1.** Gruplar, gruptaki hayvan sayıları ve uygulama Yöntemleri.

**Table 1.** Groups, numbers of animals in groups and the application method

Gruplar	Gruptaki Hayvan Sayısı	Uygulama Yöntemi
Kontrol	8	Ad libitum beslenme yapıldı.
Vitamin C	8	Vitamin C (200 mg.kg. <sup>-1</sup> ) oral beslenme
Bor	8	Bor (5 mg.kg. <sup>-1</sup> ) i.p. uygulama
Vit.C+Bor	8	Vitamin C (200 mg.kg. <sup>-1</sup> ) oral beslenme + Bor (5 mg.kg. <sup>-1</sup> ) i.p. uygulama

## BULGULAR

Çalışmada tüm gruplarda elde edilen trigliserit, HDL, LDL ve kolesterol parametrelerine yönelik veriler Tablo 2`de, hemogram parametrelerine ilişkin veriler ise Tablo 3`te verildi. Çalışmada trigliserit, HDL, LDL ve kolesterol seviyelerinde; gruplar arasında bir farklılık tespit edilmedi ( $p > 0,05$ ) (Tablo 2). Bununla birlikte, vitamin C ve B'un birlikte uygulandığı sıçanlarda diğer uygulama gruplarındaki sıçanlara göre

istatistiksel anlamda önemli düzeyde ( $p < 0,05$ ) lökosit sayısı ve ortalama alyuvar hacmi (MCV) düzeylerinin azaldığı ve trombosit sayısının ise arttığı tespit edildi (Tablo 3). Yalnız vitamin C uygulanan sıçanların yalnız B uygulanan sıçanlara göre önemli düzeyde ( $p < 0,05$ ) düşük lökosit sayısına sahip oldukları bulundu (Tablo3).

**Tablo 2.** Erkek sıçanlarda 200 mg.kg.<sup>-1</sup> vitamin c takviyesinin ve 5 mg.kg.<sup>-1</sup> bor uygulamasının Trigliserit, HDL, LDL ve Kolesterol parametrelerine etkisi (n=8, mean $\pm$ SE)

**Table 2.** Effects of 200 mg.kg.<sup>-1</sup> vitamin c supplementation and mg.kg.<sup>-1</sup> boron administration on Trigliseride, HDL, LDL and Cholesterol parameters in male rats (n=8, mean $\pm$ SE)

Parametreler	Kontrol	Vitamin C	Bor	Vit. C + Bor
Trigliserit mg/dL	49,62 $\pm$ 7,85	53,37 $\pm$ 6,95	51,12 $\pm$ 5,51	46,12 $\pm$ 3,18
HDL mg/dL	27,40 $\pm$ 2,34	24,11 $\pm$ 1,56	25,78 $\pm$ 1,69	24,37 $\pm$ 1,01
LDL mg/dL	6,55 $\pm$ 0,68	6,25 $\pm$ 0,45	6,01 $\pm$ 0,34	5,61 $\pm$ 0,54
Kolesterol mg/dL	37,00 $\pm$ 2,72	34,50 $\pm$ 1,85	33,87 $\pm$ 1,58	33,50 $\pm$ 1,77

**Tablo 3.** Erkek sıçanlarda 200 mg.kg.<sup>-1</sup> vitamin C takviyesinin ve 5 mg.kg.<sup>-1</sup> bor uygulamasının hemogram parametrelerine etkisi (n=8, mean±SE)

**Table 3.** Effect of 200 mg.kg.<sup>-1</sup> Vitamin C supplementation and 5 mg.kg.<sup>-1</sup> Boron administration on hemogram parameters in male rats (n=8, mean ± SE)

Parametreler	Kontrol	Vitamin C	Bor	Vit.C+Bor
Lökosit (x10 <sup>3</sup> )	7,39±0,29 <sup>ab</sup>	6,93±0,52 <sup>b</sup>	8,59±0,48 <sup>a</sup>	6,87±0,69 <sup>b</sup>
Eritrosit (x10 <sup>6</sup> )	7,37±0,09	7,47±0,02	6,44±0,88	7,74±0,14
Hemoglobin (g/dl)	13,96±0,13	13,92±0,21	13,58±0,23	11,83±1,53
Hematokrit (%)	42,15±0,54	43,18±0,87	36,38±4,99	85,25±45,25
MCV (fl)	55,24±0,34 <sup>a</sup>	56,45±0,68 <sup>a</sup>	56,03±0,64 <sup>a</sup>	52,48±0,58 <sup>b</sup>
MCH (pg)	18,34±0,29	18,87±0,25	20,65±1,98	17,79±0,12
MCHC (g/dl)	33,7±0,24	33,23±0,19	36,69±3,59	33,66±0,10
Trombosit (x10 <sup>3</sup> )	794,25±24,07 <sup>b</sup>	712,75±27,12 <sup>b</sup>	704,62±10,87 <sup>b</sup>	959,13±23,09 <sup>a</sup>

**a,b:** Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklılık istatistiksel anlamda önemlidir (p<0,05).

**MCV:** Ortalama Eritrosit Hacmi, **MCH:** Her Bir Kırmızı Kan Hücrendeki Ortalama Hemoglobin, **MCHC:** Belli Bir Miktar Kırmızı Kan Hücrendeki Hemoglobin Yoğunluğu,

## TARTIŞMA

Değişik gıda takviyelerinin hematolojik değerlerde meydana getirdiği değişimler, sağlıklı yaşamın kontrol programları içerisinde ve çevre ile beslemenin kan yapan organlara etkisinin gösterilmesinde gereklidir. Ayrıca kullanılan gıda takviyelerinin istenmeyen veya beklenmeyen yan etkilerinin belirlenmesinde başvurulan parametreler arasında yer alması bakımından da önemlidir (Durmuş ve ark. 2018). Çalışmada; serum biyokimyasal parametrelerini etkilemede 5 mg.kg.<sup>-1</sup>B ilavesinin yeterli olduğu yönündeki bildirim (Eren ve Uyanık. 2007) dikkate alınarak beslenme ve bakım şartları aynı olan erişkin erkek Wistar Albino cinsi sıçanlara 5 mg.kg.<sup>-1</sup> düzeyinde B ip yolla, 200 mg.kg.<sup>-1</sup> düzeyinde vitamin C oral yolla takviye edilmiştir. Alımdan kaynaklanan minimum öldürücü borik asit dozunun 640 mg.kg.<sup>-1</sup>.gün.<sup>-1</sup> olduğu bildirilmiştir (Stokinger 1981). Çalışmada uygulamaların serum trigliserit, total kolesterol ile yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) düzeylerine etkisinin olmadığı gözlemlendi. Bu bulgu, sıçan içme

sularına (Naghii ve Samman. 1993) ve yemlerine (Naghii ve Samman. 1997) bor takviyesinin serum total kolesterol düzeyine etkilediği ve trigliserit düzeyini azalttığı yönündeki bildirimle trigliserit hariç uyumluydu. Benzer şekilde, domuzlarda (Armstrong ve Spears. 2001) ve yumurtacı tavuklar (Mızrak ve Ceylan. 2009) ile etlik piliçlerde (Şimşek, 2011) yapılan değişik düzeylerde bor takviyesi ile besleme çalışmalarında da kan lipid düzeylerinde bor takviyesinin herhangi bir değişime yol açmadığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, değişik düzeylerde bor takviye edilmiş yemlerle beslenen domuz (Armstrong ve ark. 2000) ve etlik piliçlerde (Kurtoğlu ve ark. 2005) serum total kolesterol ile trigliserit düzeylerinin arttığı, yumurtacı tavuklarda (Olgun 2011) ise tam tersi azaldığı bulunmuştur. Çalışmada elde edilen bulgular ile diğer çalışmalar arasında gözlenen bulgular arasındaki farklılıkların nedeni, denemelerde kullanılan hayvan türü ile takviye edilen B'un kaynağı (İnce ve ark. 2010), düzeyi (Kaya ve Macit. 2018) ve süresi (Başoğlu ve ark. 2000) ile ilişkili olabilir.

Nitekim, Eren ve Uyanık (2007)'ın, değişik düzeylerde (0, 5, 10, 50, 100, 200 ve 400 mg.kg-1) B takviyesi yapılan yemlerle beslenen yumurtacı tavuklarda yaptıkları çalışmalarında; tüm B takviyesinin total kolesterol düzeylerini azalttığı, bunun yanında serum trigliserid düzeylerinin 5 mg.kg-1 B ilave edilen sığanlar hariç diğer tüm gruplardaki sığanlarda azaldığı ( $p<0.05$ ) tespit edilmiştir.

Kolesterolün vücuttaki steroid yapıdaki hormonların ana kaynağını oluşturması bildirimi (Noyan 1989) ile B'un erkeklerde plazma testosteron konsantrasyonlarını artırma eğiliminde olan plazma estradiol düzeylerini artırabileceği veya ek bir mekanizma cinsiyet steroidlerinin konsantrasyonunu değiştirerek doğurganlığı bozabileceği yönündeki bildirim (Bello ve ark. 2018) dikkate alınır, bu çalışmada kullanılan düzeydeki B'un kan lipid profilinde bir değişikliğe yol açmayacağı, vitamin D3, testosteron ve östrojen de dahil olmak üzere birçok steroid hormonun üretimini etkilemeyeceği (Bita ve ark. 2022) ileri sürülebilir. Bu; çeşitli kolesterol kaynaklı hormonal etkiler üzerindeki bazı etkileşimlerin, B ve östrojen kombinasyonunun kalsiyum, fosfor, magnezyum ve diğer minerallerin emilimini artırabilmesi açısından minerallerin düzenlenmesinde de rol oynayabildiği bildirimi (Sheng ve ark. 2001) açısından önemli olabileceği görünmektedir.

Hücrelerde antioksidan etkisi iyi bilinen vitamin C'nin, adrenal steroidogenez (Patak ve ark. 2004) ve katekolamin sentezlenmesi (Patak ve ark. 2004; Harrison ve May 2009) dahil memelilerin fizyolojik sistemleri üzerinde etkisinin olduğu bilinmektedir. Çalışmada; vitamin C takviyelerinin serum trigliserit, kolesterol, HDL ve LDL düzeylerine etkisinin olmaması, vitamin C takviyesinin lipid profili üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı bununla birlikte, başlangıçta dislipidemi veya düşük C vitamini olan alt popülasyonlarda takviyeyi takiben kan

lipitlerinde önemli düşüşler olduğu yönündeki bildirimi (Ashor ve ark. 2016) desteklemektedir.

Düzensiz ve dengesiz beslenmeye bağlı dislipidemi problemlerindeki artışın yol açtığı sağlık sorunlarından dolayı (O'Malley ve ark. 2020), günlük beslenmeye takviye yapılabilecek gıda takviyeleri içinde B'un da yer alabilmesi ancak kan lipid parametrelerindeki değişimlere B takviyesinin etkisinin ortaya konmasıyla mümkündür. Lipit parametrelerinden total kolesterol, LDL ve HDL düzeylerindeki değişimlere bakarak, gıda takviyesi ya da ilaç çalışmalarının tamamında sağlık açısından risk tahmini yapılabilmekte ve klinik yararlar değerlendirilebilmektedir (Cortes ve ark. 2014). Çalışmanın bulguları; B ve vitamin C'nin çalışmada kullanılan düzeyleri ve uygulama sürelerinde gerek tek başlarına gerekse birlikte takviyelerinin lipid parametrelerinden total kolesterol, LDL ve HDL düzeylerinde herhangi bir değişime yol açmadığını göstermektedir. Bu bulgular, her iki katkı maddesinin birlikte takviye olarak kullanılmasının vücut lipid metabolizmasına olumsuz bir etkisinin olmadığına ve dislipidemi problemlerine yol açmayacağına işaret etmektedir.

Plazma sıvısı ve eritrosit, lökosit ve trombosit hücrelerinin oluşturduğu kan, vücutta tüm doku ve organlar ile temas halinde olmasından dolayı, doku ya da organlarda meydana gelen değişimleri yansıtmaktadır (Etim ve ark. 2014). Bu nedenle, hematolojik değerler, insan ve hayvanlardaki besin eksikliği, toksisite ve sağlık durumlarının incelenmesinde karşılaştırma için bir standart olarak hizmet edebilmektedir (Oyawoye ve Ogunkunle. 2004). Kan hücreleri yaşam süreleri kısa olması nedeniyle, hematopoetik organlarda sürekli üretilmeleri gerekmektedir (Noyan 1989). Bu nedenle, takviye gıda olarak kullanılan maddelerin, hematopoetik organlarda kan hücrelerinin üretimine olumsuz etki doğurmaması gerekmektedir. B için hematopoez ve bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerini

gösteren bazı deneysel kanıtlar bulunmaktadır (Newkirk ve ark. 2014; Durmuş ve ark. 2018).

Çalışmada hem vitamin C hem de B uygulamalarının eritrosit sayısı, hematokrit değer ve hemogloblin düzeylerine etkisinin olmadığı, vitamin C'nin B ile takviyesinin birlikte kullanılmasının lökosit sayısını düşürdüğü ve trombosit sayısını ise artırdığı gözlemlendi. Bu bulgular, B ve vitamin C'nin birlikte kullanılmasının hematolojik parametrelerin normal değerleri arasında olumsuz bir etkiye sahip olmadıklarını göstermektedir. Bununla birlikte, kritik hastalarda takviye olarak kullanılmalarında özellikle lökosit sayısını düşürmesi ve trombosit sayısını artırması nedeniyle dikkatli olunması gerekebilir. Çalışmada, eritrositlerin boyutları hakkında bilgi vererek aneminin ayırıcı tanısında yardımcı bir gösterge olan MCV düzeylerinin, vitamin C ve B'un tek başlarına takviyelerine göre birlikte kullanılmalarına bağlı olarak azaldığı bulundu. Bununla birlikte, çalışmada tüm uygulamalarda MCV ile elde edilen değerlerin sıçanlar için normal kabul edilen referans değerler (46-65 fl) arasında yer aldığı gözlemlendi (Kaya ve Çenesiz 2010).

Değişik düzeylerde B minerali verilen sıçanlarda B'un uygulama doz miktarı arttıkça, lökosit sayısında azalma olduğu tespit edildi (Durmuş ve ark. 2018). Bu azalmanın sıçanların gelişmesinde borik asidin yan etki göstermediği ifade edilen (Farfán-García ve ark. 2016) düzeyin (17,5 mg.kg.-1.gün.-1) üzerindeki düzeyde (20 mg.kg.-1) ilavede istatistiksel anlamda önemli olduğunun gözlenmesi (Durmuş ve ark. 2018), bu çalışmada kullanılan B düzeyinin (5 mg.kg.-1 gün) lökosit sayısını etkileyecek düzeyin (20 mg.kg.-1gün) altında olmasından kaynaklanabilir. Nitekim sıçanlarda 5-10 mg.kg.-1 gün doz düzeyi (Durmuş ve ark. 2018) ile 15 mg.kg.-1gün doz düzeyinde B oral olarak verildiğinde lökosit sayısının etkilenmediği bildirilmektedir (Yıldırım ve ark. 2017). Bununla birlikte, çalışmada, vitamin C ile birlikte B takviyesinin lökosit sayısını düşürmüş olması,

antioksidan özellik taşıyan iki takviye gıda maddesinin birlikte kullanılmasının savunma hücreleri üzerine etkisinin olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen eritrosit sayısı, hemogloblin miktarı, hematokrit değer ile MCV, MCH, MCHC ve trombosit sayısı; sıçanlarda bildirilen normal (sırasıyla 5-10x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>, 11-18 g dl.-1, %36-57,46-65 fl, 11,9-19,0 pg, 25,9-35,1 g. dl.-1 ve 500-1300x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>) değerlere (Kaya ve Çenesiz, 2010b) yakın ya da arasında bulunmuştur.

## SONUÇ

Tüm dokularla temas halinde olması ve dokularda meydana gelen değişimlerin kan değerlerine de yansımaları nedeniyle önemli bir biyolojik substrat olan kandaki hematolojik ve serum lipid parametrelerini incelediğimiz bu çalışmada, antioksidan özelliklere sahip vitamin C ve B'un birlikte kullanılmalarının çalışmada incelenen parametreler üzerine belirgin bir etkiye sahip olmadıkları gözlemlendi. Bununla birlikte, çalışmada kullanılan düzeyde vitamin C ve B'un gerek yalnız gerekse birlikte takviyelerinin, kalp ve damar hastalıklarında rolü olan kandaki kolesterol seviyesini azaltmada etkilerinin olmadığı görüldü. Bu bulgular; birçok biyokimyasal reaksiyonda koenzim olarak işlev gören ve vücuttaki ana metabolik süreçlerin fizyolojik işleyişine yardımcı olan vitamin C ile B'un birlikte kullanılabileceklerini göstermektedir. B takviyelerinin sağlık alanında gittikçe artan kullanımı dikkate alındığında, B'un değişik vitaminlerle birlikte kullanılmasının akademik literatüre kaydedtirilmesi bakımından bu çalışmanın bulguları önemlidir. B'un düşük düzeylerinin bile bazı biyolojik işlemlere müdahale edebilmesi, vitaminlerle birlikte tedavide kullanılmasındaki seçenek bakımından değerlendirilmesinde hekimlere ve araştırmacılara önemli bilgiler sunacaktır. Bu nedenle, çalışmada elde edilen bulguların; insan ve hayvanlarda B takviyelerine bağlı sorunlar ve alınması gereken önlemler ile insan



ve hayvan sağlığına etkilerini inceleyen çalışmalara katkı sunacağı kanaatine varılmıştır.

**Açıklama:** Bu çalışmanın verileri ilk yazarın doktora tez çalışmasından alınmıştır

**ıkar atışması:** Yazarlar bu makalede herhangi bir çıkar atışması olmadığını beyan etmişlerdir.

**Finansal Destek:** Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (20.SAĞ.BİL.38) tarafından desteklenmiştir.

**Etik İzin:** alışma, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından (24.06.2020 tarih ve 2020/04.32 numara) verilen etik onayı ile yapılmıştır.

## KAYNAKLAR

**Armstrong, T. A., & Spears, J. W. (2001).** Effect of dietary boron on growth performance, calcium and phosphorus metabolism, and bone mechanical properties in growing barrows. *Journal of animal science*, 79(12), 3120-3127.

**Armstrong, T. A., Spears, JW., Crenshaw, TD., & Nielsen, FH., (2000).** Boron supplementation of a semipurified diet for weanling pigs improves feed efficiency and bone strength characteristics and alters plasma lipid metabolites. 130(10):2575-81. doi: 10.1093/jn/130.10.2575.

**Ashor, A. W., Siervo, M., van der Velde, F., Willis, N. D., & Mathers, J. C. (2016).** Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials testing the effects of vitamin C supplementation on blood lipids. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 35(3), 626-637. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.05.021>

**Başeğmez, M., & Eryavuz, A. (2021).** Sıanlarda oral yüksek doz vitamin C takviyesinin serum vitamin C, leptin ve kortizol parametrelerine etkisi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 14(3), 339-345.

**Başoğlu, A., Sevin, M., Gzelnbehtaş, H. and Civelek, T. (2000):** Short communication: Effect of Borax on serum lipid profile in dogs. *Online J. Vet. Res.* 4, 153-156.

**Bello, M., Guadarrama-García, C., Velasco-Silveyra, L. M., Farfán-García, E. D., & Soriano-Ursúa, M. A. (2018).** Several effects of boron are induced by uncoupling steroid hormones from their transporters in blood. *Medical Hypotheses*, 118, 78-83.

**Bişa, A., Scorei, I. R., Blşeanu, T. A., Ciocilteu, M. V., Bejenaru, C., Radu, A., ... & Benner, S. A. (2022).** New insights into boron essentiality in humans and animals. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9147.

**Cortes, VA., Busso, D., Maiz, A., Arteaga, A., Nervi, F., & Rigotti, A., (2014).** Physiological and pathological implications of cholesterol. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*;19(3):416-28. doi: 10.2741/4216.

**Durmuş, İ., İnce, S., Salim, M.N., Eryavuz, A., & Kkkurt, İ. (2018).** Gentamisin verilen sıçanlara bor uygulamasının hematolojik parametre düzeylerine etkileri. *Kocatepe Veterinary Journal*, 11(2), 140-147.

**Eren, M., & Uyanik, F. (2007).** Influence of dietary boron supplementation on some serum metabolites and egg-yolk cholesterol in laying hens. *Acta Veterinaria Hungarica*, 55(1), 29-39.

**Etim NN, Williams ME, Akpabio U, Offiong EE. (2014).** Haematological parameters and factors affecting their values. *Agricultural Science*. 2(1):37-47.

**Farfán-García, E. D., Castillo-Mendieta, N. T., Ciprés-Flores, F. J., Padilla-Martínez, I. I., Trujillo-Ferrara, J. G., & Soriano-Ursúa, M. A. (2016).** Current data regarding the structure-toxicity relationship of boron-containing compounds. *Toxicology letters*, 258, 115-125.

**Farombi, E.O., Ugwuezunmba, M.C., Ezenwadu T.T., Ovevemi M.O., & Ekor M., (2008).** Tetracycline-induced reproductive toxicity in male rats: effects of vitamin C and N-acetylcysteine *Experimental and Toxicologic Pathology*, 60 (1), 77-85.

**Giannetto, C., Fazio, F., Nava, V., Arfuso, F., Piccione, G., Coelho, C., ... & Licata, P. (2022).** Data on multiple regression analysis between boron, nickel, arsenic, antimony, and biological substrates in horses: The role of hematological biomarkers. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(2), e22955.

**Harrison, F. E., & May, J. M. (2009).** Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(6), 719-730.

**İnce, S., Kucukkurt, I., Cigerci, IH., Fidan, AF., & Eryavuz, A., (2010).** 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: 161-164.

**Kabu, M., & Akosman, M. S. (2013).** Biological effects of boron. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 225: 57-75.

**Kaya, H. & Macit, M. (2020).** Yumurtlamanın Son Dönemindeki Yumurtacı Tavukların Rasyonlarına Bor

- (Orthoborik Asit) İlavesinin Serum Lipid ve Protein Profili Üzerine Etkisi . Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi , 17 (1) , 66-76 . DOI: 10.33462/jotaf.488195
- Kaya, Z., & Çenesiz, G. Z. (2010).** Deney hayvanlarının fizyolojisi. In: Aksoy A, Kolbakır F, Hökelek M editors. Laboratuvar hayvanları. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları 2010; p.42.
- Kurtoğlu, F., Kurtoğlu, V., Celik, I., Kececi, T., & Nizamlioğlu, M. (2005).** Effects of dietary boron supplementation on some biochemical parameters, peripheral blood lymphocytes, splenic plasma cells and bone characteristics of broiler chicks given diets with adequate or inadequate cholecalciferol (vitamin D3) content. *British poultry science*, 46(1), 87-96.
- Mızrak, C., & Ceylan, M. (2009).** Damızlık yumurtacı tavuk yemlerine farklı seviye ve formda bor ilavesinin performans, kemik gelişimi ve bazı kan parametreleri üzerine etkisi 6. Ulusal Zootečni Bilim Kong. 60(69), 24-26.
- Naghii M. R., & Samman S. (1993).** Role of boron in nutrition and metabolism. *Prog. Fd. Nutr. Sci.*, 14, 331-349.
- Naghii, M. R., & Samman, S. (1997).** The effect of boron on plasma testosterone and plasma lipids in rats. *Nutrition Research*, 17(3), 523-531.
- Newkirk, C. E., Gagnon, Z. E., & Pavel Sizemore, I. E. (2014).** Comparative study of hematological responses to platinum group metals, antimony and silver nanoparticles in animal models. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 49(3), 269-280.
- Noyan, A. (1989).** Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. *Hacettepe Kitapçılık, Ankara*, 1989.
- Olgun, O. (2011).** Yumurtacı tavuk rasyonlarına farklı seviyelerde ilave edilen bor ve bakırın performans, yumurta kabuk kalitesi, yumurta sansı kolesterolü ve kemiğin biyomekanik özelliklerine etkisi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- O'Malley, P. G., Arnold, M. J., Kelley, C., Spacek, L., Buelt, A., Natarajan, S., Donahue, M. P., Vagichev, E., Ballard-Hernandez, J., Logan, A., Thomas, L., Ritter, J., Neubauer, B. E., Downs, J. R. (2020).** Management of Dyslipidemia for Cardiovascular Disease Risk Reduction: Synopsis of the 2020 Updated U.S. Department of Veterans Affairs and U.S. Department of Defense Clinical Practice Guideline. *Annals of Internal Medicine*, 173(10), 822-829. doi:10.7326/M20-4648
- Oyawoye, B. M., & Ogunkunle, H. N. (2004).** Biochemical and haematological reference values in normal experimental animals. New York: Mason, 212-216.
- Patak, P., Willenberg, H. S., & Bornstein, S. R. (2004).** Vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and adrenal medulla. *Endocrine research*, 30(4), 871-875.
- Sheng, M. H. C., Janette Taper, L., Veit, H., Qian, H., Ritchey, S. J., & William Lau, K. H. (2001).** Dietary boron supplementation enhanced the action of estrogen, but not that of parathyroid hormone, to improve trabecular bone quality in ovariectomized rats. *Biological trace element research*, 82, 109-123.
- Stokinger, H. E. (1981).** In: G.D. Clayton and F.E. Clayton (eds.), *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, 3rd Edn. John Wiley and Sons, Toronto, Canada, Pp: 1749-1769.
- Şimşek, H. (2011).** Etlik piliç rasyonlarına bor (ortoborik asit) ilavesinin performans değerleri ile tibia mineral konsantrasyonu ve bazı kan parametreleri üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniv. Fen Bil.Enst., Erzurum.
- Yıldırım, S., Celikeyen, F. C., Oto, G., Sengul, E., Bulduk, M., Tasdemir, M., & Ali Cinar, D. (2018).** An investigation of protective effects of lithium borate on blood and histopathological parameters in acute cadmium-induced rats. *Biological trace element research*, 182, 287-294.

## Antibiogram Results of *Escherichia coli* in Calf Diarrhea and *Escherichia coli* Bacteria in Aksaray Province in The Last Three Months

Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU<sup>1</sup>, Melek AYDEMİR<sup>1\*</sup>, Elif Selin ŞENOĞLU<sup>2</sup>, Zeki ARAS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Aksaray University, Aksaray, Turkey

<sup>2</sup>Şenoğlu Veterinary Clinic, Selçuklu, Konya, Turkey

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Aksaray University, Aksaray, Turkey

### ABSTRACT

*Escherichia coli* is a gram-negative, facultative anaerobic, motile, non-spore-forming rod-shaped bacterium belonging to the Enterobacteriaceae family. Pathogenic *E. coli* are divided into two groups: extraintestinal and intestinal. Intestinal *Escherichia coli* pathotypes: enterotoxigenic *E. coli* (EPEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Vero- or Shiga-toxin-producing *E. coli* (VTEC or STEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) and diffusely adherent *E. coli* (DAEC). Extraintestinal pathogenic *E. coli*: These can be listed as septicemic pathogenic *E. coli*, uropathogenic *E. coli*, avian pathogenic *E. coli*, breast pathogenic *E. coli* and those that cause uterine infections, endometrial pathogenic *E. coli*. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) is the most common cause of neonatal diarrhea in calves and is a bacterial disease that colonizes the small intestine, produces enterotoxin, and occurs among calves during the neonatal period. The aim of this study is to determine the *E.coli* isolates that cause neonatal calf diarrhea in the Aksaray region between January, February and March 2021. To be used in the study, internal organ samples (liver, heart, lung and mesenteric lymph node) of neonatal calves that died due to diarrhea were taken from 20 different cattle farms in the Aksaray region. One calf that died in each farm was included in the sampling, and a total of 20 calves were sampled. *E.coli* was isolated in 12 (60%) of the internal organ samples covering these three months. According to the antibiogram results of the samples, 50% of the isolates were converted to Amoxicillin and Erythromycin, 33.3% to Tetracycline, 58.3% to Trimethoprim-sulfamethoxazole, 66.6% to Streptomycin, 75% to Flofenicol, Gentamicin and Enrofloxacin, % 83.3 of them were found to be sensitive to Cefloxacin and Cefloxacinium.

**Keywords:** Antibiogram, diarrhea, *E.coli*, neonatal calf

\*\*\*

## Aksaray İli Buzağı İshallerinde *Escherichia coli* ve *Escherichia coli* Bakterisinin Son Üç Aylık Antibiyogram Sonuçları

### ÖZ

*Escherichia coli*, Enterobacteriaceae ailesinde yer alan gram negatif, fakültatif anaerob, hareketli, spor oluşturmeyen çomak şeklinde bir bakteridir. Patojenik *E. coli* ekstraintestinal ve intestinal olmak üzere iki gruba ayrılır. İntestinal *Escherichia coli* patotipleri: enterotoksijenik *E. coli* (EPEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Vero- veya Shiga-toksin üreten *E. coli* (VTEC veya STEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve diffuz aderent *E. coli* (DAEC)'dir. Ekstraintestinal patojenik *E. coli* ise; septisemik patojenik *E. coli*, üropatojenik *E. coli*, avian patojenik *E. coli*, meme patojenik *E. coli* ve uterus enfeksiyonlarına neden olanlar, endometriyal patojenik *E. coli* olarak sıralabilir. Enterotoksijenik *Escherichia coli* (EPEC), buzağılarda neonatal ishalin en yaygın nedenidir ve ince bağırsakta kolonize olan, enterotoksin üreten, neonatal dönemde buzağular arasında ortaya çıkan bakteriyel bir hastalıktır. Bu çalışmanın amacı 2021 yılının ocak, şubat ve mart ayları arasında, Aksaray bölgesinde bulunan neonatal buzağı ishaline sebep olan *E.coli* izolatlarını belirlemektir. Çalışmada kullanılmak üzere, Aksaray bölgesindeki 20 farklı sığır işletmesinde ishal kaynaklı ölen neonatal dönemdeki buzağuların iç organ örnekleri (karaciğer, kalp, akciğer ve mezenterik lenf düğümü) alınmıştır. Herbir işletmede ölen bir buzağı örnekleme dahil edilerek, toplam 20 adet buzağıdan örnek alınmıştır. Bu üç ayı kapsayan iç organ örneklerinin 12'sinde (%60) *E.coli* izole edilmiştir. Örneklerin antibiyogram sonuçlarına göre izolatların %50'sinin Amoksisilin ve Eritromisine, %33,3'ünün Tetrasikline, %58,3'ün Trimetoprim-sülfametoksazole, %66,6'sının Streptomisine, %75'inin Flofenikol, Gentamisin ve Enrofloksasine, %83,3'ünün Sefloksasin ve Sefloksasinyuma duyarlı olduğu tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyogram, *E.coli*, ishal, neonatal buzağı

To cite this article: Haydardeedeoğlu A.E., Aydemir M., Şenoğlu E.S., Aras Z. Antibiogram Results of *Escherichia coli* in Calf Diarrhea and *Escherichia coli* Bacteria in Aksaray Province in The Last Three Months. Kocatepe Vet J. (2023):16(4):606-613

Submission: 28.07.2023 Accepted: 16.11.2023 Published Online: 19.12.2023

ORCID ID: AEH: 0000-0002-8473-0072, MA: 0000-0002-4732-8279, ES: 0000-0001-7256-3986, ZA: 0000-0003-4564-2077

\*Corresponding author e-mail: [melekaydemir09@gmail.com](mailto:melekaydemir09@gmail.com)

## INTRODUCTION

*Escherichia coli* is a gram-negative, facultative anaerobic, motile, non-spore-forming rod-shaped bacterium belonging to the Enterobacteriaceae family (Ewers et al., 2004). Pathogenic *E. coli* are divided into two groups, extraintestinal and intestinal, according to the type of disease they cause and their virulence properties (Omerovic et al. 2017).

Basic features of intestinal *Escherichia coli* pathotypes: *E. coli* strains that cause intestinal infections are generally called 'Diarrheal *E. coli* (DEC)', meaning diarrhea. Intestinal pathotypes: enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Vero- or Shiga-toxin-producing *E. coli* (VTEC or STEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) and diffusely adherent *E. coli* (DAEC). Extraintestinal pathogenic *E. coli*: These can be listed as septicemic pathogenic *E. coli*, uropathogenic *E. coli*, avian pathogenic *E. coli*, breast pathogenic *E. coli* and those that cause uterine infections, endometrial pathogenic *E. coli* (Carlton et al. 2010).

Calf diarrhea, one of the most critical problems in calf breeding worldwide and in our country, causes economic losses. Although the future of dairy farms depends on many situations, it depends on the calves and heifers taking their place on the farm and their participation in productivity. Globally, calf deaths caused by enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) appear to be among the primary causes of death in farms' free calves (El-Seedy et al. 2016). Statistically, this means that an average of 4 calves live healthy on the farm per year. In other words, it is very important to take the necessary precautions to renew 1/4 of the herd every year (Bhat et al. 2012). Because of that, calf loss is a severe economic loss. Calf loss in the world means productivity and economic loss. Calf diarrhea is a cause of high morbidity and mortality worldwide (Wudu 2008). It has been reported that 75% of calf losses before the weaning period are due to diarrhea (Uhde et al. 2008; Bartels et al. 2010).

In the etiology of diarrhea in calves; Bacterial agents such as *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia spp.*, viral agents such as *Rotavirus (group A)*, *Coronavirus*, *Adenovirus*, *Parvovirus*, *Astrovirus*, *Calicivirus*, *Bovine Viral Diarrhea (BVD)*, and parasitic agents such as *Coccidia*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Neoascaris vitulorum* are present (Snodgrass et al. 1986). Hygiene, intensive housing of calves, colostrum management, attention to litter systems may be significant in preventing multiple infectious agents (Larson and Tyler 2005). Studies show that an agent that initiates infection makes the animal vulnerable to the effects of other pathogens. According to many studies, the most common cause of calf diarrhea is shown as Rotavirus, but it is reported that it is seen at a higher rate, especially in dairy farms and calves suckling from the mother. The second common factor is *Cryptosporidium*, but it is more

common in fattening enterprises than dairy enterprises, and *Coronavirus* is reported to be the third common cause. It is stated that the factors that cause calf diarrhea can be determined quickly and minimized with effective treatment (Snodgrass et al. 1986).

Calves with diarrhea are sick at 0-4 weeks of age, especially at 0-2 weeks; It is reported that 80% of them have an infectious cause, 50% of the positive ones have more than one factor, and 31% of them have two factors (Cho et al. 2014). The defense mechanisms of newborn calves against pathogenic factors are not developed. Since there is no antibody transmission from mother to fetus due to the presence of syndesmochorial placenta structure in cattle and the antibodies are too large, calves are born agammaglobulinemic when they are born, and they are not protected against pathogenic factors until they receive a sufficient amount of colostrum (Aldridge et al. 1992; Reber et al. 2006). Immunity generated by the ingestion of colostrum by calves is known as passive immunity. Passive immunity ends with the destruction of maternal antibodies, which lasts for 3-4 weeks (Neto et al. 2004).

*E. coli* is the most important bacterial cause of diarrhea in calves. The environmental conditions of the calf, the type of the causative agent, and the immune status of the calf play an essential role in the formation of infection. In etiology, mainly septicemic and enterotoxigenic (ETEC) (F4, F5 (= K99), F6, F41 antigens) O8, O9, O78, O45, O117, and O35 serotypes and lesser enterohemorrhagic (O157:H7) and necrotoxicogenic *E. coli* are effective. Insufficient, poor quality or no colostrum in the first hours of birth, poor maternal care in the dry period and late separation of them, lack of vitamin A, not paying attention to the cleanliness of the shelters, feeding with milk with mastitis, not paying attention to udder hygiene are the preparatory factors. It is one of the most important diseases of calves worldwide (Radostits et al. 2007). Neonatal calves are susceptible to *E. coli* (K99) infection in the first four days after birth, and watery diarrhea may occur when infected (Foster and Smith 2009).

The outer part of the small intestine, which has a low pH, provides the necessary environment for ETEC invasion. In addition, loss of infected cells, villous atrophy, and damage to the lamina propria are observed in the small intestine. The bacteria reveals the K99<sup>+</sup> antigen for attachment (Francis 1989; Figure 1). In a study, 37 *E. coli* isolated from calves with diarrhea K99 (18.9%), F41 (18.9%), heat-stable enterotoxin a (STA) (18.9%), Shiga toxin 1 (Stx1;13.5%), Shiga toxin 2 (Stx2;5.4%) and intimin (8.1%) genes have been reported to be detected by multiplex PCR (Ok et al. 2009). Although it is generally seen up to two weeks of age, it is more effective in calves less than five days old, and infected animals are also a source of infection. Morbidity varies between 30-70%, mortality is between 50-60% in the first three days of calves, and this rate decreases to 5-10% in 8-

day-old calves. The incubation period is 1-3 days (Radostits et al. 2007).

Enterotoxin production is one of the essential factors that determine pathogenicity in *E. coli* strains. ETECs produce mainly two types of enterotoxins: thermolabile toxin (LT), which becomes inactive at 60°C for 30 minutes, and thermostable toxin (ST), which can withstand 100°C for 15 minutes. Enterotoxin type differs according to animal species. While more LT is synthesized in strains that spread in calves and cattle, ST synthesis varies according to species (Debroy and Maddox 2001; Hossain et al. 2007; Rigobelo et al. 2006). Enteropathogenic (EPEC) *E. coli* is reported to cause diarrhea due to the destruction of microvilli and the release of verotoxin after it invades the small and large intestines (Pospischil 1989). When calves are born in heavily contaminated environmental conditions, virulent pathogens may settle in the distal part of the intestines and cause disease before normal adult intestinal flora is formed (Fecteau et al. 2009). Although bacteria survive and are ingested in the small intestines, they must interact with the fimbriae on the microvilli of the small intestine through fimbrial antigens, defined as "K antigens", in order to become biologically active. K-antigens in the capsule of gram (-) bacteria are characterized by the presence of LPS with O antigens on the cell wall, and they do this with their flagella with H antigens (Foster and Smith 2009; Hunt 2010).

The presence of uncontrollable inflammation in infected extravascular tissues plays a role in the pathogenesis of sepsis and septic shock (Buttenschoen et al. 2010). Dehydration with electrolyte loss due to *E. coli*, sepsis due to elevated LPS, and related changes are observed in calf diarrhea (Bicknell and Noon 1993; Roberts et al. 2011).

Septicemia or coli-septicemia in newborn (neonatal) calves progresses rapidly in the first 2-6 days of their lives and often results in death (Fecteau et al. 2009). Diarrhea of newborn calves due to *E. coli* is a disease characterized by diarrhea that is usually mucous, watery, yellow, grayish or green, sometimes bloody, and, if left untreated, progressive dehydration, resulting in increased electrolyte loss and death (Bicknell and Noon 1993; Figure 2). In the very early stages of the disease, clinical symptoms are not evident and exhibit similar symptoms to other disease symptoms (Fecteau et al. 2009). Hyperdynamic and hypodynamic phase changes are observed depending on the increase in LPS. The absence of the sucking reflex is a mental state picture that mainly occurs between moderate depression and coma, and it is also reported as non-specific clinical findings (Roberts et al. 2011).

In cases of diarrhea, significant fluid-electrolyte losses occur in animals. As a result of diarrhea, a significant amount of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> is lost in the feces. While this causes a decrease in blood pH, plasma HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> value, Na and Cl concentrations in calves, it causes an increase in the base deficit and plasma K

concentration. In calves with diarrhea, blood volume decreases due to excessive extracellular fluid loss, it affects the urinary excretion of K, and the excretion of H ions decreases due to disruptions in renal functions and acid-base balance. In addition, metabolic acidosis occurs due to the rapid increase in H<sup>+</sup> ions in the blood. In calf diarrhea, H<sup>+</sup> ions, which increase excessively in the plasma, pass into the intracellular fluid, causing K<sup>+</sup> ions, 98% of which are in the cell, to pass into the extracellular fluid. As a result, hyperkalemia occurs (Özkan 2017).

Depending on the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) that occurs with sepsis, one or multiple organ failures and changes in clinical and laboratory findings due to this occur (Nguyen et al. 2007). Diarrhea, mental changes, stagnation, hyperemia of mucous membranes, low blood pressure, increase in heart rate, coldness in extremities, loss of appetite, hypovolemia, decrease in urine output, high fever (sometimes low fever), increase in respiratory rate (Jacobi 2002; Cunnington and Nadel 2008; Fecteau et al. 2009), abnormal changes in coagulation, leukocytosis/leukopenia, thrombocytopenia, elevated (sometimes decreased) blood sugar and hyperlactatemia (Nguyen et al. 2007), disseminated intravascular coagulation (DIC) and multi-organ failure (CSF) (Zeerleder et al. 2005) symptoms are observed.

Shock consists of 4 different mechanisms that cause clinical manifestations of acute circulatory failure (Weil and Henning 1979). Decreases in venous recycling (internal or external fluid losses) resulting from decreased circulating volume is the first mechanism. The second is severe arrhythmias (such as ventricular tachycardia or severe AV blocks) or decreased heart contraction (infarction, ischemia, myopathy, myocarditis). The third mechanism is obstruction due to pneumothorax, pulmonary embolism, or cardiac tamponade. Finally, the fourth reason is unstable tissue perfusion due to loss of vascular rhythm (as a result of anaphylaxis, sepsis, or spinal injury) (Vincent and de Backer 2013).

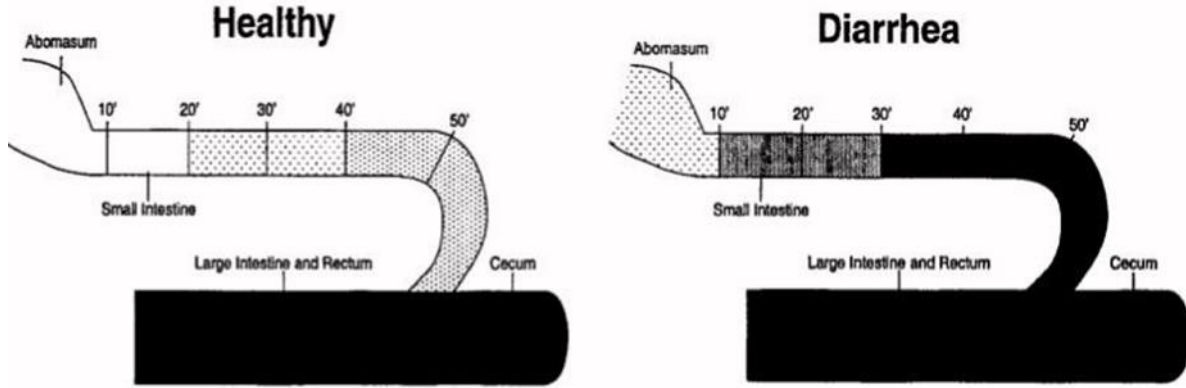
Several mechanisms have been proposed for the development of multi-organ failure. These are: tissue or cell hypoxia, stimulation of tissue apoptosis, translocation of microorganisms or their compounds from the gastrointestinal tract, immune system disorders and mitochondrial dysfunction (Osterbur et al. 2014). Presumably, MODS develops due to decreased oxygen availability and use, changes in cellular metabolism, and cardiovascular dysfunction leading to tissue hypoxia. Tissue hypoxia occurs due to metabolic acidosis and decreased oxygen ratio (Evans and Smithies 1999). Pulmonary dysfunction is a picture of persistent hypoxemia due to increased permeability of pulmonary vessels, pulmonary epithelial damage, development of micro-thrombosis, pulmonary edema, and a decrease in surfactant production (Ware and Matthay 2000). In addition, the development of oliguria and azotemia shapes renal dysfunction. Acute

renal failure develops due to deterioration of renal blood flow resulting from microvascular alternation with the development of hypotension (Evans and Smithies 1999). Gastrointestinal dysfunction primarily presents with ileus, but the loss of the normal barrier function of the gastrointestinal mucosa may also occur. In addition, losses in the mucosal barrier together with bacterial translocation or absorption of endotoxin contribute to the pathogenesis of MODS (Rombeau and Takala 1997).

Commonly occurring central nervous system dysfunction may be characterized by depression. However, due to severe damage to neurons, septic

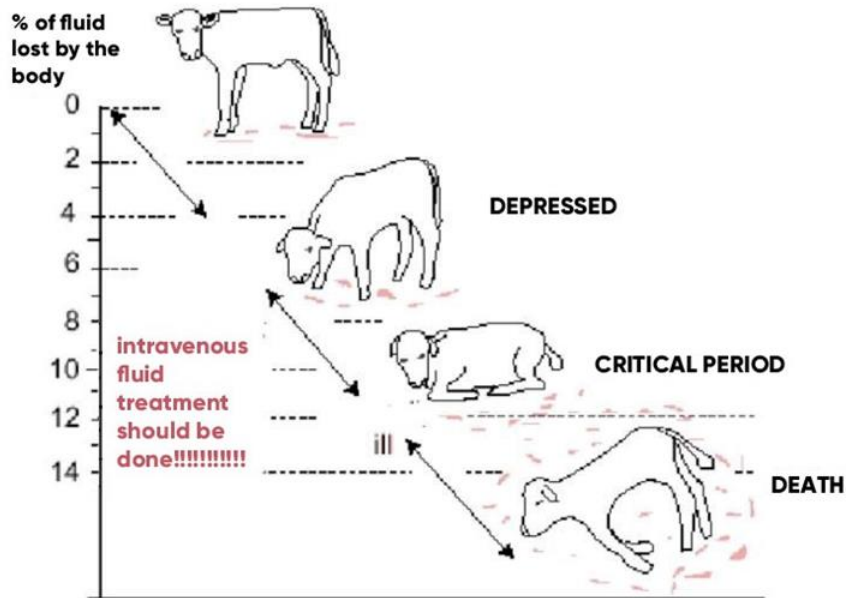
encephalopathy may also occur (Papadopoulos et al. 2000).

Since there are many serotypes of *E. coli* infection, the agent's identification is important in selecting the vaccine to protect from the disease. In cases of calf diarrhea, the Latex Agglutination Test is frequently used to identify *E. coli* K99<sup>+</sup> (Cho et al. 2010). PCR testing helps identify complex to isolate viruses in cell cultures or bacteria that take a long time to grow. In addition to the above-mentioned diagnostic methods, the diagnosis of enteropathogens can also be made with immunochromatographic test kits (Çitil et al. 2004).



**Figure 1:** Diagram of distribution and concentration of *E. coli* bacteria in the healthy intestinal tract and diarrheal intestinal tract of a calf. It shows that the number of *E. coli* in the large intestine of diarrheal and healthy calves are similar, but it increases the number of *E. coli* in the small intestines of diarrheal calves, especially in the distal jejunum and ileum (Constable, P.D. 2009).

**Şekil 1:** Sağlıklı ve ishallerli buzağuların bağırsak sisteminde *E. coli* bakterisinin dağılımı ve konsantrasyonunun diyagramı. İshallerli ve sağlıklı buzağuların kalın bağırsağında *E. coli* sayısının benzer olduğunu ancak ishallerli buzağuların ince bağırsaklarında, özellikle distal jejunum ve ileumda *E. coli* sayısını arttırdığını göstermektedir (Constable, P.D. 2009).



**Figure 2:** Changes in the percentage of dehydration, taking into account the clinical symptoms and health of calves (Wattiaux 2005).

**Şekil 2:** Buzağuların klinik semptomları dikkate alınarak dehidrasyon yüzdesindeki değişiklikler gösterilmiştir (Wattiaux 2005).

## MATERIALS and METHODS

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).

### Samples

To be used in the study, internal organ samples (liver, heart, lung and mesenteric lymph node) were taken from neonatal calves that died due to diarrhea in 20 different cattle enterprises in the Aksaray region between January, February and March 2021. One calf that died in each farm was included in the sampling, and samples were taken from a total of 20 calves. Before death, the animals were found to show different symptoms of *E. coli* infections. Dominant clinical findings; septicemia, enteritis, dehydration, weakness, acidosis. All samples were transferred to the laboratory in an icebox with minimal delay for bacteriological examination to detect *E. coli* isolates.

### Cultivation

Samples collected for the isolation of the *E. coli* pathogen were inoculated into 5% sheep blood agar (Oxoid) and MacConkey Agar (Oxoid) and incubated at 37°C for 18-24 hours. Lactose fermenter (pink) colonies were streaked on eosin methylene blue agar

and confirmed as *E. coli* using standard biochemical tests according to Collee et al. (1996).

### Antibacterial Susceptibility Test

The standard disc diffusion method determined the antibiotic susceptibility of isolated strains (CLSI 2012). Isolates incubated in tryptic soy broth (TSB, Oxoid) at 37°C for 18-24 hours were seeded on Mueller-Hinton Agar (Oxoid), and antibacterial susceptibility test discs were placed 3 cm apart and incubated at 37°C for 24 hours. For this purpose, Amoxicillin (25 µg), Enrofloxacin (5 µg), Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.5 µg-23.5 µg), Gentamicin (10 µg), Tetracycline (30 µg), Streptomycin (10 µg), Erythromycin (15 µg), Florfenicol (30 µg), Ciprofloxacin (5 µg) and Cefquinome (30 µg) antibiotic discs (Oxoid) were used.

## RESULTS

*E. coli* was isolated from 12 (60%) of a total of 20 internal organ samples. As a result of the antibacterial susceptibility test, 50% of the isolates were Amoxicillin and Erythromycin, 33.3% Tetracycline, 58.3% Trimethoprim-sulfamethoxazole, 66.6% Streptomycin, 75% Florfenicol, Gentamicin and Enrofloxacin, and 83.3% were found to be sensitive to Cefquinome and Ciprofloxacin (Figure 3).

Antibiotic	S	I	R
Amoxicillin (25 µg)	6	2	4
Enrofloxacin (5 µg)	9	1	2
Trimethoprim- sulfamethoxazole (25 µg)	7	2	3
Gentamicin (10 µg)	9	1	2
Tetracycline (30 µg)	4	4	4
Streptomycin (10 µg)	8	2	2
Erythromycin (15 µg)	6	3	3
Florfenicol (30 µg)	9	2	1
Ciprofloxacin (5 µg)	10	1	1
Cefquinome (30 µg)	10	1	1

S: sensitive; I: moderately sensitive; R: resistant

**Figure 3:** Antibacterial resistance in all *E. coli* strains isolated from calves  
**Şekil 3:** Buzağılardan izole edilen tüm *E. coli* suşlarındaki antibakteriyel direnç

## DISCUSSION

Neonatal calf diarrhea remains one of the most important problems facing livestock farming, causing major economic losses (Garcia et al. 2000). Calf diarrhea; It still causes significant economic losses in our country due to reasons such as growth retardation, deaths and treatment costs. Today, it continues to be a cause of high morbidity and mortality globally (Wudu et al. 2008; El-Seedy et al. 2016). Calf diarrhea is difficult to control effectively. Because the prevention and control of calf diarrhea depends on multiple factors such as the environment, pathogenic microorganisms and the disease-causing power of the factors, nutrition and passive transfer (Waltner-Toews et al. 1986; Balıkçı 2012; Cho and Yoon 2014).

Identification of the likely causative pathogen in diarrheal outbreaks is important to enable targeted preventive measures such as vaccination and the identification of possible risk factors or sources of infection (Izzo et al. 2011). It has been reported that 75% of calf losses before weaning and 26% in the neonatal period are due to diarrhea (Uhde et al. 2008; Bartels et al. 2010; Cho and Yoon 2014). *E. coli* are the most common pathogens screened in calves under 2 months of age (Achá et al. 2004). Their prevalence varies depending on the geographical location of farms, farm management practices, and herd size (Cho and Yoon 2014).

In this study, internal organ samples taken from calves that died due to diarrhea during the neonatal period in 20 different farms were used. *E. coli* was isolated from 12 (60%) of a total of 20 internal organ samples. In internal organ samples of other calves, bacterial infections such as *Clostridium* and *Campylobacter species* (Myers et al. 1984), which require specific or enriched culture media, can be attributed to fatal diarrhea caused by bacterial infections that cannot develop in culture media (Cho et al., 2010). At the same time, since the washout period of antibiotics used for treatment in calves with diarrhea was not taken into account, residues of antibiotics were associated with false negative results in microbiological cultures.

The prevalence of the *E. coli* isolate in our current study was similar to that reported by Awad et al. (1979) 80% and Haggag and Khaliel (2002) 82% show compatibility with their studies; The prevalence rates obtained in other studies are respectively compared to Azzam et al. (2006) 5%, El-Shehedi et al. (2013) 35.83%, Osman et al. (2013) 63.6% and Hassan (2014) 50%, which were found to be lower compared to our study. These differences in prevalence rates of *E. coli* in calves with diarrhea may be attributable to geographic locations and management practices, with ETEC infection occurring primarily through ingestion of contaminated food or water, ETEC infection being among the primary pathogens in the neonatal period, hygienic measures, as well as hygienic measures (Cho and Yoon 2014). Despite the increasing availability of

vaccines against other *E. coli*-associated pathogens and the continued emphasis on optimizing colostral transfer of passive immunity, improved treatment protocols for calf diarrhea are required.

The main factor in the treatment of calves with diarrhea during the neonatal period is the administration of intravenous fluids and oral electrolyte solutions. In addition, the effectiveness of antimicrobial drugs in the treatment of calf diarrhea is controversial. Calves with diarrhea are more likely to fail or partially fail the passive transfer pass. Therefore, it should not be forgotten that diarrhea is more likely to be bacteremic and antimicrobial agents may be indicated for treatment. The active ingredients of antibiotics used in treatment should be made more specific through laboratory diagnosis and antibiogram tests (Berge et al. 2005).

According to the results of antibiogram tests performed against different *E. coli* serogroups and untyped groups, it was determined that *E. coli* showed different degrees of sensitivity to antibiotics. While mostly *E. coli* isolates show high resistance to the majority of antimicrobials, only; showed high sensitivity to marbofloxacin, spectinomycin and neomycin. The reason for this is that most of the animals are probably unconsciously treated with antimicrobial drugs, resulting in the development of high resistance (Berge et al. 2005; Duse et al. 2015).

In our study, an antibiogram test was performed to determine whether the antibiotics used against the *E. coli* agent in the Aksaray region were sensitive. It determined the antibiotic susceptibility of strains isolated by the standard disc diffusion method (CLSI 2012). The isolates, which were incubated in tryptic soy medium (TSB, Oxoid) at 37°C for 18-24 hours, were planted on Mueller-Hinton Agar (Oxoid) and antibacterial susceptibility test discs were placed at 3 cm intervals and incubated at 37°C for 24 hours. According to the antibiogram results of the samples, 50% of *E. coli* isolates were treated with Amoxicillin and Erythromycin; 33.3% Tetracycline; 58.3% to Trimethoprim-sulfamethoxazole; 66.6% to Streptomycin; 75% to Flofenicol, Gentamicin and Enrofloxacin; 83.3% of them were determined to be sensitive to Cefloxacin and Cefloxacinium.

## CONCLUSION

Every year in the Aksaray region, many calves die during the neonatal period due to *E. coli* and calf losses cause serious damage to the country's economy. In addition, antibiotics that are still used unconsciously today and their treatment costs continue to cause problems that cannot be ignored. Determining the enteropathogen that causes calf diarrhea and choosing the right antibiotic in treatments through antibiogram testing against this pathogenic agent have an important place in treatments. In this way, it is believed that preventing antibiotic resistance, avoiding unnecessary antibiotic use and reducing mortality rates with correct



treatment will also contribute to the country's economy. 20 calves were used in our study, and studies with more animals are needed to evaluate the prevalence rates of *E.coli* isolates in the Aksaray region and to determine the resistance and sensitivity to commonly used antibiotics.

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

**Authors' Contributions:** 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".

**Acknowledgement:** I thank all the authors for their contribution to this study.

**Explanation:** This study was previously presented as an undergraduate graduation paper (2020).

## REFERENCES

- Acha, S. J., Kühn, I., Jonsson, P., Mbazima, G., Katouli, M., & Möllby, R. (2004). Studies on calf diarrhoea in Mozambique: prevalence of bacterial pathogens. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45(1), 1-10.
- Aldridge, B., Barry, F., & Adams, M.A. (1992). Role of colostral transfer in neonatal calf mangement: failure of acquisition of passive immunity. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, 14, 265-269.
- Balıkçı, E. (2012). Neonatal ishali buzağlarda Rotavirus, Coronavirus, E. coli K99 ve Cryptosporidium parvum'un hızlı test kitleri ile teşhisi ve enteropatojen ile maternal immünite ilişkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 26(2), 73-78.
- Berge, A. C. B., Atwill, E. R., & Sischo, W. M. (2005). Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. *Preventive veterinary medicine*, 69(1-2), 25-38. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.013>
- Bhat, S.A., Juyal, P.D., & Singla, L.D. (2012). Prevalence of cryptosporidiosis in neonatal buffalo calves in Ludhiana district of Punjab, India. *Asian J Anim Vet Adv*, 7(6), 512-520.
- Bartels, C.J., Holzhauer, M., Jorritsma, R., Swart, W.A., & Lam, T. J. (2010). Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Preventive veterinary medicine*, 93(2), 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.09.020>
- Bicknell, E., Noon, & T.H. (1993). Neonatal calf diarrhea. *Anim Care Health Maint*, 19-23. <https://doi.org/10.1016/B978-141603591-6.10021-1>
- Buttenschoen, K., Radermacher, P., & Bracht, H. (2010). Endotoxin elimination in sepsis: physiology and therapeutic application. *Langenbeck's archives of surgery*, 395(6), 597605.
- Carlton L. G., John F. P., Glenn S., Charles O. T. (2010); Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, p.267 – 307. <https://doi.org/10.35864/evmd.530084>
- Cho, Y.I., Kim, W.I., Liu, S., Kinyon, J.M., & Yoon, K.J. (2010). Development of a panel of multiplex real-time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of major agents causing calf diarrhea in feces. *J Vet Diagn Invest.*, 22 (4), 509-517.
- Cho, Y.I., & Yoon, K.J. (2014). An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of veterinary science*, 15 (1), 1-17.
- CLSI National Committee for Clinical Laboratory Standards, (M02-A11). Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing, Pennsylvania Wayne. 2012, Vol. 32.
- Constable, P.D. (2009). Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary treatments. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25(1), 101-120. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.012>
- Collee, J. G., Fraser, A. G., Marmion, B. P., & Simmons, A. (1996). Practical medical microbiology. vol. 1. Churchill Livingstone, New York, 131-149.
- Cunnington, A., & Nadel, S. (2008). New therapies for sepsis. *Curr Top Med Chem.*, 8, 603614.
- Çitil, M., Arslan, M.Ö., Güneş, V., Erdoğan, H.M. (2004). Neonatal buzağı ishallerinde *Cryptosporidium* ve *Eimeria* enfeksiyonlarının rolü. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg*, 10 (1), 5964.
- Debroy, C., & Maddox, C.W. (2001). Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Animal Health Research Reviews*, 2 (2), 129-140.
- Duse, A., Waller, K. P., Emanuelson, U., Unnerstad, H. E., Persson, Y., & Bengtsson, B. (2015). Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. *Journal of dairy science*, 98(1), 500-516. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8432>
- El-Seedy, F. R., Abed, A. H., Yanni, H. A., & Abd El-Rahman, S. A. A. (2016). Prevalence of *Salmonella* and *E. coli* in neonatal diarrheic calves. *Beni-Suef University journal of basic and applied sciences*, 5(1), 45-51.
- Evans, T.W., & Smithies, M. (1999). ABC of dysfunction: Organ dysfunction. *Br Med J*, 318(7198), 1606-1609. <https://doi.org/10.1136/bmj.318.7198.1606>
- Fecteau, G., Smith, B.P., & George, L.W. (2009). Septicemia and meningitis in the newborn calf. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25(1), 195-208. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.004>
- Foster, D.M., & Smith, G.W. (2009). Pathophysiology of diarrhea in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25 (1), 13-36. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.013>
- Francis D.H, Allen S.D, & White R.D, (1989): Influence of bovine intestinal fluid on the expression of K99 pili by *Escherichia coli*. *American journal of veterinary research*, 50(6), 822-826.
- Garcia, A., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Orden, J. A., Cid, D., Sanz, R., Gómez-Bautista, M., & De La Fuente, R. (2000). Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 23(3), 175-183. [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(99\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(99)00071-5)
- Hossain, M.T., Siddique, M.P., Hossain, F.M.A., Zinnah, M.A., Hossain, M.M., Alam, M.K., & Choudury, K.A. (2008). Isolation, identification, toxin profile and antibiogram of *Escherichia coli* isolated from broilers and layers in Mymensingh district of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 6 (1), 1-5.

- Hunt, J.M. (2010). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Clin Lab Med., Clinics in laboratory medicine*, 30 (1), 21-45. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.11.001>
- Izzo, M. M., Kirkland, P. D., Mohler, V. L., Perkins, N. R., Gunn, A. A., & House, J. K. (2011). Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Australian veterinary journal*, 89(5), 167-173. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2011.00692.x>
- Jacobi, J. (2002). Pathophysiology of sepsis. *Am J Health-Syst Pharm.*, 59: 3-8. [https://doi.org/10.1093/ajhp/59.suppl\\_1.S3](https://doi.org/10.1093/ajhp/59.suppl_1.S3)
- Larson, R.L., & Tyler, J.W. (2005). Reducing calf losses in beef herds. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 21 (2), 569-584. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2005.02.009>
- Myers, L. L., Firehammer, B. D., Border, M. M., & Shoop, D. S. (1984). Prevalence of enteric pathogens in the feces of healthy beef calves. *American journal of veterinary research*, 45(8), 1544-1548.
- Neto, R.M., Packer, I.U., & Doprado, G.V.B. (2004). Colostral Immunoglobulins Absorption in Canchim and Nelore Calves. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33 (6), 1544-1547. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000600021>
- Nguyen, S.T., Nguyen, D.T., Le, D.Q., Le Hua, L.N., Nguyen, T.V., Honma, H., & Nakai, Y. (2007). Prevalence and first genetic identification of *Cryptosporidium* spp. in cattle in central Vietnam. *Veterinary parasitology*, 150(4), 357-361. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.010>
- Ok, M., Güler, L., Turgut, K., Ok, Ü., Şen, I., Gündüz, I.K., & Güzelbekteş, H. (2009). The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoonoses and public health*, 56(2), 94-101. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01156.x>
- Omerovic, M., Müştak, H. K., & Kaya, İ. B. (2017). *Escherichia coli* Patotiplerinin Virulens Faktörleri. *Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 28(1), 1-6. <https://doi.org/10.35864/evmd.530084>
- Osterbur, K., Mann, F.A., Kuroki, K., & Declue, A. (2014). Multiple organ dysfunction syndrome in humans and animals. *J Vet Intern Med*, 28 (4), 1141-1151. <https://doi.org/10.1111/jvim.12364>
- Özkan, C. (2017). İshalli Buzağlarda Hiperkalemi ve Tedavi Yaklaşımları. *Van Buzağı Hastalıkları sempozyumu*, 59-69.
- Papadopoulos, M.C., Davies, D.C., Moss, R.F., Tighe, D., & Bennett, E.D. (2000). Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit Care Med*, 28 (8), 3019-3024.
- Pospischil, A. (1989). Pathologie und Pathogenese infektiöser Durchfallerkrankungen beim Kalb, *Vet*, 5: 27-32.
- Radostits, O.M., & Gay, C.C. (2007). Traumatic reticuloperitonitis In: Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, PD Eds. *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*. 10th edn. Elsevier Health Sciences, Philadelphia, PA, USA, 337-352.
- Reber, A.J., Lockwood, A., Hippen, A.R., & Hurley, D.J. (2006). Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. *Vet Immunol Immunopathol*, 109: 139-150. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.08.014>
- Rigobelo, E.C., Gamez, H.J., Marin, J.M., Macedo, C., Ambrosin, J.A., & Ávila, F.A.D. (2006). Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrhetic calves. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 58 (3), 305-310. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000300003>
- Roberts, J.A., Roberts, M.S., Semark, A., Udy, A.A., Kirkpatrick, C.M., Paterson, D.L., Roberts, M.J., Kruger, P., & Lipman, J. (2011). Antibiotic dosing in the „at risk“ critically ill patient: Linking pathophysiology with pharmacokinetics/pharmacodynamics in sepsis and trauma patients. *BMC Anesthesiology*, 11 (1): 1471-1453.
- Rombeau, J.L., & Takala, J. (1997). Summary of round table conference: gut dysfunction in critical illness. *Intensive care medicine*, 23(4), 476-479.
- Smith, G.W. (2009). Treatment of calf diarrhea: oral fluid therapy. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25(1), 55-72.
- Snodgrass, D.R., Terzolo, H.R., Sherwood, D., Campell, I., & Menzies, J.D. (1986). Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet Rec*, 119; 31-34.
- Uhde, F.L., Kaufmann, T., Sager, H., Albini, S., Zanoni, R., Schelling, E., & Meylan, M. (2008). Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland. *The Veterinary record*, 163(12), 362-366. <https://doi.org/10.1136/vr.163.12.362>
- Vincent, J.L., & de Backer, D. (2013). Circulatory shock. *N Engl J Med*, 369, 1726-34. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24171518/>
- Waltner-Toews, D., Martin, S.W., & Meek, A.H. (1986). An epidemiological study of selected calf pathogens on Holstein dairy farms in southwestern Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 50(3), 307.
- Ware, L.B., & Matthay, M.A. (2000). The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 342 (18), 1334-1349.
- Wattiaux, M.A. (2005). Heifer raising - birth to weaning. *Neonatal diarrhea*. Babcock Institute for International Dairy Research and Development, 2005.
- Weil, M.H., & Henning, R. (1979). *New Concepts in the Diagnosis and Fluid Treatment of Circulatory Shock: Thirteenth Annual Becton, Dickinson and Company Oscar Schwidetsky Memorial Lecture*. *Anesthesia & Analgesia*, 58 (2), 124-132.
- Wudu, T., Kelay, B., Mekonnen, H.M., & Tesfu, K. (2008). Calf morbidity and mortality in smallholder dairy farms in Ada'a Liben district of Oromia, Ethiopia. *Tropical animal health and production*, 40(5), 369-376.
- Zeerleder, S., Hack, C.E., & Wuillemin, W.A. (2005). Disseminated intravascular coagulation in sepsis. *CHEST Journal*, 128 (4), 2864-2875.

## A case of surgical treatment of Type 2 Atresia Ani and Rectovaginal Fistula in a Kitten

Melek Ece ARINIR<sup>1\*</sup>, Emine Esmâ ÇERKEZ<sup>2</sup>, Zihni MUTLU<sup>3</sup>

<sup>1-2-3</sup>Department of Veterinary Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul University-Cerrahpasa, Istanbul, Türkiye

### ABSTRACT

Congenital type 2 atresia ani, accompanied by a rectovaginal fistula, is a rare condition in cats that forms an abnormal connection between the rectum and vagina. This case presentation involves a 4-week-old female British Shorthair kitten brought to Istanbul University Cerrahpasa Faculty of Veterinary Medicine Hospital Surgical Clinics with complaints of congenital type 2 atresia ani and the accompanying rectovaginal fistula. The owners of the kitten sought veterinary care due to difficulties with defecation since birth. Upon clinical examination, the absence of an anal opening and contamination of the vulvar cavity with feces were observed. Contrast X-ray confirming that the anus was closed and surgery was decided. During the surgery, anal sphincters were preserved, and a "+" shaped incision was made in the anus to reach the rectum. The rectum was separated from the vaginal connection, and the fistula was closed. The kitten recovered smoothly and, during a one-year follow-up, was able to defecate normally by going to the litter box on its own. This case presentation highlights the importance of surgical interventions in the diagnosis and treatment of atresia ani and rectovaginal fistula.

**Keywords:** Atresia ani, Congenital anomaly, Kitten, Pseudohermaphroditism, Rectovaginal fistula

\*\*\*

### Bir Yavru Kedide Tip 2 Atresia Ani ve Rectovajinal Fistülün Cerrahi Tedavisi Olgusu

### ÖZ

Rektovajinal fistülün eşlik ettiği konjenital tip 2 atresia ani, kedilerde rektum ve vajina arasında anormal bir bağlantı oluşturan nadir bir durumdur. Bu olgu sunumunda konjenital tip 2 atresia ani ve eşlik eden rektovajinal fistül şikayeti ile İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Hastanesi Cerrahi Klinikleri'ne getirilen 4 haftalık dişi British Shorthair yavru kedi olgusunu içermektedir. Yavru kedinin sahipleri, doğumdan itibaren dışkılama güçlüğü nedeniyle kliniğimize başvurdu. Klinik muayenede anal açıklığın olmadığı ve vulvar kavitenin dışkı ile kontamine olduğu görüldü. Anüsün kapalı olduğunu teyit eden kontrastlı grafi çekildi ve ameliyat kararı verildi. Ameliyat sırasında anal sfinkterler korundu ve rektuma ulaşmak için anüste "+" şeklinde bir kesi yapıldı. Rektum vajinal bağlantıdan ayrıldı ve fistül kapatıldı. Yavru kedi sorunsuz bir şekilde iyileşti ve bir yıllık takipte kendi başına kum kabına giderek normal bir şekilde dışkıladığı görüldü. Bu olgu sunumu, atresia ani ve rektovajinal fistülün tanı ve tedavisinde cerrahi girişimlerin önemini vurgulamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Atresia ani, Kongenital anomali, Pseudohermafroditizm, Rektovajinal fistül, Yavru kedi

To cite this article: Arinir ME, Çerkez EE, Mutlu Z. A case of surgical treatment of Type 2 Atresia Ani and Rectovaginal Fistula in a Kitten Kocatepe Vet J. (2023) 16(4): 614-618.

Submission: 02.08.2023 Accepted: 29.10.2023 Published Online: 13.11.2023

ORCID ID: MEA: 0000-0003-0713-4696, EEC: 0000-0002-6832-2263, ZM: 0000-0002-8686-1914

\*Corresponding author e-mail: ecearinir@gmail.com

## INTRODUCTION

Congenital anorectal malformations are infrequent in young dogs and cats. The most prevalent type is anorectal atresia, which may also be linked to rectovaginal or rectourethral fistula. These malformations arise during the embryonic development of the cloacal region (Kurt et al., 2022; Pourrseza et al., 2023). Four types of anorectal atresia have been documented. Type 1 is characterized by congenital anal stenosis and represents the mildest form. Type 2 is referred to as imperforate anus, where the rectum may form a blind pouch and the anus remains undeveloped. In Type 3, the proximal rectum culminates in a cranial blind pouch, and the anus is undeveloped. Type 4 involves the proximal rectum terminating in a cranial blind pouch, but the anus forms normally (Aslan et al., 2009; Tomsa et al., 2011). Occasionally, rectovaginal fistula can develop in dogs and, rarely, in cats with Type 2 anorectal atresia, as well as in cats with Type 3 anorectal atresia (Jardel et al., 2013; Choi et al., 2022; Pourrseza et al., 2023).

Symptoms observed in cases of anorectal atresia vary depending on its severity and may include abdominal pain, abdominal distension, tenesmus, reduced defecation, cystitis, and growth retardation (Tomsa et al., 2011). Additionally, in females with concurrent rectovaginal fistula, feces might be expelled through the vulva (Ellison et al., 2012). In the early stages, the condition may go unnoticed due to the mother cat's regular cleaning of the kitten's perineum (Kurt and Turan, 2021). However, the transition from a liquid diet provided by the mother's milk to a solid diet after weaning can exacerbate clinical symptoms. While liquid diets facilitate the passage of stools, a switch to solid food may lead to constipation and tenesmus (Rahal et al., 2007). Consequently, anorectal atresia often remains undetected until tenesmus and abdominal distension become prominent or until the patient is weaned off milk (Ellison et al., 2012).

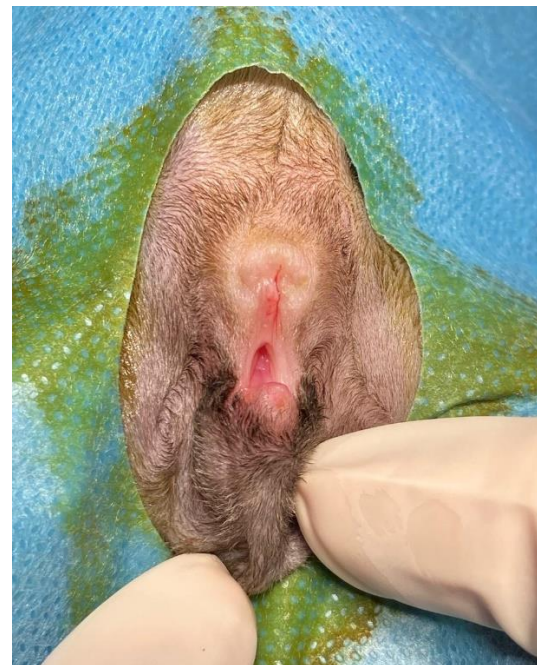
According to veterinary literature, female animals are the most commonly affected by anorectal atresia (Ellison et al., 2012). Anesthesia and surgery can become more challenging depending on the overall condition, age, and size of the patient. Due to the low incidence of anorectal atresia in cats, there are only a few reported cases in the literature. Some affected cats are euthanized early based on the belief that surgical correction would not yield significant benefits (Choi et al., 2022). Consequently, the true prevalence remains unknown, as euthanasia is often performed on many animals (Mahler and Williams, 2005). The primary goals of surgery are to restore anorectal continuity, preserve the external anal sphincter, restore normal colon function, and eliminate the rectum-vagina connection (Pourrseza et al., 2023). However, further publications are needed to assist in surgical planning, provide recommendations, and predict the disease prognosis (Ellison et al., 2012;

Choi et al., 2022). Vaginography and fistulography examinations can aid in a detailed diagnosis by administering contrast material through the vagina or fistula pathway (Choi et al., 2022)

The perineal approach is utilized for the surgical correction of type 1, type 2, and type 3 anorectal atresia. Surgical intervention should be performed before the development of conditions such as megacolon, urinary tract infections, and chronic abdominal distension (tension, swelling). Despite the possibility of surgical treatment for anorectal atresia, the prognosis is generally unfavorable due to the young age, small size, and typically poor body condition of affected animals, leading to a higher mortality rate (Kim et al., 2013).

## CASE REPORT

An informative note was provided regarding a 4-week-old, 500-gram female Scottish Fold kitten case brought to Istanbul University-Cerrahpaşa Hospital Clinic. In the medical history, it was mentioned that the kitten is smaller compared to its siblings, the anus is contaminated with feces, and there is abdominal swelling. During the clinical examination, it was observed that the anus is completely closed (Figure 1.), and the feces are coming from the vagina. Additionally, a pseudoscrotum-like structure was detected around the vulva. The patient's anal reflex was found to be normal.



**Figure 1:** The image shows a penis and scrotum-like structure under the vulva.



When iohexol (Omnipaque, Nycomed Ireland Ltd, Cork, Ireland), a contrast agent for radiographic examination, was administered through the rectum with an injector, it was observed that the contrast agent progressed through the rectum (Figure 2.). The patient was diagnosed with type 2 anorectal atresia and rectovaginal fistula. Accordingly, blood analysis was conducted, and an operation plan was made.



**Figure 2:** X-ray image after contrast agent administration.

The patient was induced under anesthesia with 6-8 mg/kg propofol (Propofol-PF 1%, Polifarma, İstanbul, Turkey). Intubation was performed using a size 2 cuffed endotracheal tube. Subsequently, anesthesia was maintained with 100% oxygen and isoflurane (Forane, Abbott, Latina, Italy). The patient received an intravenous dose of 30 mg/kg ceftriaxone (Novosef, Sanofi, İstanbul, Turkey) and a subcutaneous dose of 0.2 mg/kg meloxicam (Melox, Nobel Limited, İstanbul, Turkey). During the operation, a continuous intravenous infusion of 10

ml/kg/h of 0.9% NaCl solution (Poliflex Polifarma, İstanbul, Turkey) was administered.

The patient was placed in a sternal position on the surgical table. A support was placed underneath to slightly elevate the anus. The patient's urinary tract was catheterised. After ensuring asepsis and antisepsis of the surgical site, a plus-shaped incision was made around the anus to reach the rectum. During the dissection, extra care was taken to preserve the external anal sphincter and the anal sacs. The rectum and rectovaginal fistula were identified. The connection between the rectum and vagina was separated, and a 4/0 polydioxanone suture (Neoxone, Setpa, İzmir, Turkey) was used to suture the upper wall of the vagina. The rectum was pulled outward and detached from its connection with the vagina. The fistula was sutured separately with simple interrupted stitches. Subsequently, the rectum was approximated to the anal region using a 4/0 polypropylene suture (Neoplene, Setpa, İzmir, Turkey) (Figure 3.)

After surgery, the patient was recommended a soft diet and advised to avoid milk. Oral amoxicillin (Amoklavin, Deva, İstanbul, Turkey), was prescribed at a dose of 12.5 mg/kg for one week. Daily cleaning with hypochlorous acid (Crystalin, NHP, İzmir, Turkey) was recommended. Regular communication was established to obtain updates on the patient's bowel movements and to gather consistent information.

At the patient's follow-up visit after 4 days, it was learned from the provided history that the patient had experienced fecal incontinence. Subsequent follow-up was conducted over the phone, and it was revealed that after 1 month, the patient was able to control their bowel movements and used her litter box for defecation (Figure 4.)



**Figure 3:** Urinary catheter is shown with arrow. The image includes step-by-step surgery images.



**Figure 4:** Self-defecation of the patient in the litter box one month after the operation.

## DISCUSSION

Atresia ani is a result of a defect that occurs during the embryonic differentiation of the cloaca and has been reported to be present in all domestic animals (Adewunmi et al., 2007). The rectovaginal fistula serves as a common opening for both the urogenital system and the gastrointestinal tract (Rahal et al., 2007). With the exception of type 1 anorectal atresia, surgery remains the sole treatment option for this condition. However, surgical intervention can be challenging due to the young age and generally poor physical condition of the patients, leading to potential functional complications (Mahler and Williams, 2005). Anatomic typing should be performed to customize the treatment approach for each case (Pourrseza et al., 2023). It has been reported that untreated cases of type 2 anorectal atresia with rectovaginal fistula may lead to secondary complications such as megacolon, upper urinary tract infections, and kidney damage. Therefore, surgical treatment is necessary to correct this congenital anomaly (Jardel et al., 2013).

Postoperative complications following surgical correction, regardless of the anatomical type, may involve fecal incontinence due to the congenital absence of the anal sphincter or damage to its innervation during dissection (Pourrseza et al., 2023). Additionally, excessive tissue damage during surgery can result in the formation of scar tissue and narrowing of the passage (Choi et al., 2022). Furthermore, wound dehiscence and infection are

potential complications that can be observed after the operation (Jardel et al., 2013). In our case, wound dehiscence was observed one week after the surgery, and successful healing was achieved with area cleaning and routine wound treatment.

In the treatment of rectovaginal fistula and anorectal atresia, two commonly used surgical techniques are reported in the literature. In one approach, the fistula is isolated, transected, and the rectal and vulvar defects are closed separately, followed by anal reconstruction. The other technique involves excising the affected segment by cutting from the cranial end of the fistulous opening, and then suturing the distal part of the rectum to the anus (Rahal et al., 2007). Experimental treatments for induced rectovaginal fistula have involved closure along its length with multiple purse-string sutures and the use of adhesive material (Rahal et al., 2007). Additionally, Jardel et al. conducted a study where they reported that the use of fistula flap in the surgical treatment of rectovaginal a fistula was curative.

Beneficially, patients with congenital anomalies such as anorectal atresia should be thoroughly investigated for any associated abnormalities. The literature reports cases where hydrocephalus, sacrococcygeal dysgenesis, and tail agenesis have been observed concurrently with anorectal atresia (Sedigh et al., 2010; Jardel et al., 2013). In our case, we observed the presence of a scrotal-like structure in the perineal region. It was learned that the patient was able to go to the sand and defecate on her own and did not

experience any difficulties in her one-year follow-up by phone after the operation.

Hermafroditism is a condition where individuals possess both female and male reproductive organs, and concurrently, structures characteristic of both genders are found in the genital tracts and external genital organs. Pseudohermafroditism, also known as false hermafroditism, describes situations where the phenotypic gender characteristics do not align with the actual reproductive organs an individual possesses (Baki Acar, 2016). In our case presentation, the cat exhibited a structure resembling a clitoris and a vagina, yet two structures akin to testes were also observed. Due to the cat's age at the time of surgery and the limited information obtained during the recovery process, a definitive diagnosis could not be made, leading to the assumption that the case might be an instance of pseudohermafroditism. Following a recent phone conversation, based on limited photographs and information provided, it was determined that the cat currently has two testicular sacs; one containing a testis while the other is empty (Figure 5). In line with recommendations from a previously published similar study, a histopathological examination of the gonads and an analysis of the chromosomal structure were suggested (Vallefuoco et al., 2013). However, the financial constraints of the pet owner prevented these examinations from being conducted.



**Figure 5:** Recent testicular images obtained from the pet owner.

## CONCLUSION

As a result, atresia ani is a rare condition in cats and can be successfully treated with surgical intervention. In this case, it was observed that the patient was able to defecate on their own without damaging the anal sphincter, thus proving the success of the surgical intervention.

**Conflict of interest:** The authors have no conflicts of interest to report.

**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."

**Authors' Contributions:** All authors have read and approved the finalized manuscript. All authors have read and approved the finalized manuscript.

## REFERENCES

- Aslan, L., Karasu, A., Gençcelep, M., Bakır, B., Alkan, İ. (2009). Ruminantlarda Konjenital Anorektal Anomali Olgularının Değerlendirilmesi. *Y.Y.U. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(1), 31-36.
- Baki Acar, D. (2016). Melez Irk Bir Köpekte Yalancı Erkek Hermafroditizm Olgusu. *Kocatepe Vet J*, 9(3), 247-251.
- Choi, C., Jung, H., Jeong, S. (2022). Rectovaginal Fistula and Atresia Ani in a Kitten: A Case Report. *J Vet Clin*, 39, 32-37.
- Ellison, G.W., Papazoglou L.W. (2012). Long-term results of surgery for atresia ani with or without anogenital malformations in puppies and a kitten: 12 cases (1983–2010). *J Am Vet Med Assoc*, 240(2), 186-192.
- Jardel, N., Vallefuoco, R., Viateau V. (2013). A Fistula Flap Technique for Correction of Type II Atresia Ani and Rectovaginal Fistula in 6 Kittens. *Veterinary Surgery*, 42, 180-185.
- Kibar Kurt, B., Gürsel, A., Çakmakçı, E. (2022). Anoplasty Surgery in a Cat with Type I Atresia Ani. *Animal Health Prod and Hyg*, 11(1), 36-39.
- Kibar Kurt, B., Turan, G. (2021). Successful treatment of type III atresia ani and rectovaginal fistula in a kitten. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 90, 189-193.
- Kim, M., Hwang, Y.H., Choi, W., Lee, J.H. (2013). Surgical Correction of Congenital Type III Atresia ani with Rectovaginal Fistula in a Cat. *J Vet Clin*, 30(5), 376-379.
- Mahler, S., Williams, G. (2005). Preservation of the Fistula for Reconstruction of the Anal Canal and the Anus in Atresia Ani and Rectovestibular Fistula in 2 Dogs. *Veterinary Surgery*, 34, 148-152.
- Pourreza, B., Alizadeh, A., Hallajzadeh, N., Eidi, N. (2023). Atresia Ani Type II with Rectovaginal Fistula in a 6-Week-Old Kitten. *Iran J Vet Surg*, 18(1).
- Rahal, S.C., Vicente C.S., Mortari A.C., Mamprim, M.J., Caporalli, E.H.G. (2007). Rectovaginal fistula with anal atresia in 5 dogs. *Can Vet J*, 48, 827-830.
- Remi-Adewunmi, B.D., Fale, M.S., Usman, B., Lawal, M. (2007). A Retrospective Study Of Atresia Ani Cases At The Ahamdu Bello University Veterinary Teaching Hospital Zaria, Nigeria. *Nigerian Veterinary Journal*, 28(1), 48-53.
- Salari Sedigh, H., Jamshidi, Sh., Rajabioun, M., Massoudifard, M. (2010). Rectovaginal fistula and atresia ani in a kitten: a case report. *Int.J.Vet.Res.*, 4(2), 87-88.
- Tomsa, K., Major, A., Glaus, T.M. (2011). Behandlung von Atresia ani Typ I mittels Ballondilatation. *Schweiz. Arch. Tierbeilk.*, 153(6), 277-280.
- Vallefuoco, R. A. (2013). Type II atresia ani associated with rectovaginal fistula in a male pseudohermaphrodite kitten. *The Canadian Veterinary Journal*, 54(5), 475-478.