

e- ISSN : 2757-5179



Bozok Veterinary Sciences



Volume 6

Issue 1

June

2025

**ON BEHALF ON YOZGAT BOZOK UNIVERSITY FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
OWNER**

Prof. Dr. Evren YAŞAR, Rektor

EDITOR-IN-CHIEF (BAŞ EDİTÖR)

Dr. Zafer GÖNÜLALAN, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

ISSUE EDITORS (SAYI EDİTÖRLERİ)

Dr. Zafer GÖNÜLALAN, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Serkan KÖKKAYA, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi- YOZGAT

ASSISTANT EDITORS (EDİTÖR YARDIMCILARI)

Dr. Elmas ULUTAŞ, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. Güvenç GÖKALP, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. Seçil SEVİNÇ TEMİZKAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi- YOZGAT

Dr. Sema ÇAKIR BAYRAK, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

BASIC SCIENCE EDITORS (TEMEL BİLİM EDİTÖRLERİ)

Dr. Elmas ULUTAŞ, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

**PRECLINICAL SCIENCES- FOOD HYGIENE AND TECHNOLOGY EDITORS
(KLİNİK ÖNCESİ BİLİMLERİ- GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ EDİTÖRLERİ)**

Dr. Seçil SEVİNÇ TEMİZKAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. İmran GARİP, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

CLINICAL SCIENCES EDITORS (KLİNİK BİLİMLERİ EDİTÖRLERİ)

Dr. Sema ÇAKIR BAYRAK, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

**ZOOTECHNICS- ANIMAL NUTRITION AND NUTRITION DISEASES EDITORS
(ZOOTEKNİ- HAYVAN BESLEME VE BESLEME HASTALIKLARI EDİTÖRLERİ)**

Dr. Tünay KARAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

**PROOF READING
(SON OKUMA)**

Dr. Tuğrul ATALAY, Yozgat Bozok Üniversitesi Şefaati Meslek Yüksek Okulu-YOZGAT

ENGLISH ADVISER (İNGİLİZCE DANIŞMANI)

Dr. Mehmet Ertuğ YAVUZ, Yozgat Bozok Üniversitesi Yabancı Diller Yüksekokulu-YOZGAT

STATISTICS ADVISER (İSTATİSTİK DANIŞMANI)

Araş. Gör. Güven GÜNGÖR, Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi-BİNGÖL

TYPESETTER AND DESIGN (DİZGİ VE TASARIM)

Dr. Serkan KÖKKAYA, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Araş. Gör. Nevzat Emre ASLAN, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

WEB DESIGN (WEB TASARIMI)

Dr. Güvenç GÖKALP, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

Dr. Emre SAYAR, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi-YOZGAT

BROADCAST BOARD (YAYIN KURULU)

Dr. İsmail Hakkı NUR, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Çağrı Çağlar SİNMEZ, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Gültekin ATALAN, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ

Dr. Osman KÜÇÜK, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi -KAYSERİ

Dr. Vehbi GÜNEŞ, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi-KAYSERİ



NATIONAL ADVISORY BOARD (ULUSAL DANIřMA KURULU)

- Dr. Ali Cesur ONMAZ**, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-KAYSERİ
- Dr. Alper SEVİMLİ**, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-AFYONKARAHİSAR
- Dr. Emin řENGÜL**, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-ERZURUM
- Dr. Enver YAZAR**, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-KONYA
- Dr. Didem PEKMEZCİ**, Ondokuzmayıs Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-SAMSUN
- Dr. Güner KÜÇÜKBAYRAM**, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-KAYSERİ
- Dr. Kürřat ALTAY**, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-SİVAS
- Dr. Mehmet ELMALI**, Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakóltesi- HATAY
- Dr. Muammer ELMAS**, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakóltesi- KONYA
- Dr. Mustafa Sinan AKTAř**, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-ERZURUM
- Dr. Mustafa ARICAN**, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-KONYA
- Dr. Mustafa İSSİ**, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakóltesi- ELAZIĞ
- Dr. Ramazan ERENLER**, Tokat Gaziosmanpařa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakóltesi-TOKAT
- Dr. Selim KUL**, Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakóltesi, YOZGAT
- Dr. Serkan YILDIRIM**, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-ERZURUM
- Dr. Sevgi DURNA DAřTAN**, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakóltesi-SİVAS
- Dr. Sinan VICIL**, Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-TEKİRDAĞ
- Dr. Siyami KARAHAN**, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakóltesi-KIRIKKALE
- Dr. Suat ERDOĞAN**, Trakya Üniversitesi Tıp Fakóltesi-EDİRNE

INTERNATIONAL ADVISORY BOARD (ULUSLARARASI DANIřMA KURULU) ,

- Dr. Askarbek TULEBAYEV**, Manas University, Faculty of Veterinary Medicine-KYRGYZSTAN
- Dr. Atiqur RAHMAN**, Jamia Millia Islamia University, Faculty of Natural Sciences-INDIA
- Dr. Csilla TOTHOVA**, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice-SLOVAKIA
- Dr. Levan MAKARADZE**, Georgian State Agrarian University-GEORGIA
- Dr. Maged El-ASHKER**, Mansoura University, Faculty of Veterinary Medicine-EGYPT
- Dr. Oskar NAGY**, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice-SLOVAKIA
- Dr. Rais AHMAD**, Cholistan University of Veterinary and Animal Sciences-PAKISTAN
- Dr. René van den HOVEN**, Vienna Veterinary University-AUSTRIA
- Dr. Ryane E. ENGLAR**, College of Veterinary Medicine, University of Arizona-USA
- Dr. Salah AKKAL**, University of Mentouri Constantine, Phytochemistry and Physico-chemical and Biological Analysis Laboratory- ALGERIA
- Dr. Zehra HAJRULAI-MUSLIU**, Skopje Faculty of Veterinary Medicine-MACEDONIA



Bozok Veterinary Sciences

2025; 6 (1)

BU SAYININ HAKEM KURULU

Prof. Dr. Akın KIRBAŞ – Atatürk Üniversitesi-ERZURUM

Prof. Dr. Ali Cesur ONMAZ- Erciyes Üniversitesi- KAYSERİ

Prof. Dr. Başak HANEDAN- Atatürk Üniversitesi- ERZURUM

Prof. Dr. Meryem AYDEMİR ATASEVER– Atatürk Üniversitesi-ERZURUM

Prof. Dr. Mustafa İSSİ- Fırat Üniversitesi- ELAZIĞ

Prof. Dr. Nurhan ERTAŞ ONMAZ- Erciyes Üniversitesi- KAYSERİ

Prof. Dr. Vehbi GÜNEŞ- Erciyes Üniversitesi- KAYSERİ

Prof. Dr. Vehbi GÜNEŞ- Erciyes Üniversitesi- KAYSERİ

Doç. Dr. Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU- Aksaray Üniversitesi -AKSARAY

Doç. Dr. Gizem ÇUFAOĞLU – Kırıkkale Üniversitesi-KIRIKKALE

Doç. Dr. Harun HIZLISOY- Erciyes Üniversitesi-KAYSERİ

Doç. Dr. Nilay YILDIZ- Erciyes Üniversitesi-KAYSERİ

Doç. Dr. Serhat AL- Erciyes Üniversitesi-KAYSERİ

Dr. Öğr. Üyesi Emre TÜFEKÇİ- Erciyes Üniversitesi- KAYSERİ

Dr. Öğr. Üyesi Güvenç GÖKALP- Yozgat Bozok Üniversitesi- YOZGAT

Dr. Öğr. Üyesi Murat METLİ- Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi- MUĞLA

Dr. Öğr. Üyesi Emre SAYAR-Yozgat Bozok Üniversitesi-YOZGAT

Öğr. Gör. Dr. ŞEYMA DADI- Abdullah Gül Üniversitesi- KAYSERİ

Bozok Veterinary Sciences

İçindekiler/Contents

(2025) 6,(1)

<i>Araştırma Makaleleri/ Research Articles</i>	<i>Sayfa / Page</i>
❖ Ural K. <i>Tekrarlayan ve Kronik Giardiazisli Kedilerde Fekal Mikrobiyota Transplantasyonu: Hedefe Yönelik Sağaltım.</i>	1-7
❖ Bilici SÖ, Dışhan A, Gönülalan Z. <i>Fırın Et Yemeklerine Alüminyum Gıda Tepsilerinden Olası Alüminyum Migrasyonunun Belirlenmesi*</i>	8-15
❖ Alıç Ural D. <i>Rotavirus ile Mono- ya da Ko-Enfekte Buzağılarda Bağırsak Geçirgenliğinin Bir Adım Öncesinde Serum Zonulin Seviyeleri ile Dışkı Skorlarının Yansımaları Rotavirus ile Enfekte Buzağılarda Bağırsak Geçirgenliği.</i>	16-21
❖ Alıç Ural D. <i>Polifarmaziye Maruz Kalan Buzağılarda İntestinal Mukozal Hasarlanma Mevcut Mu? Polifarmaziye Maruz Buzağılarda İntestinal Hasar.</i>	22-25
❖ Ertaş-Onmaz N, Özkaya Y ve Karakuş RN. <i>Sultan ve Hürmetçi Sazlıklarından Belirli Gıda Patojenlerine Karşı İzole Edilen Litik Fajların Fenotipik Karakterizasyonu.</i>	26-34
❖ Yılmaz E, Koca FD, Demirbaş A, Saticioglu İB, Çimen B, Öçsoy İ. <i>Synthesis of Medicinal Leech (Hirudo Verbana) Saliva-Incorporated Hybrid Nanoflowers and Evaluations of Their Biological Applications.</i>	35-40
❖ Ural K, Erdoğan H, Erdoğan S, Paşa S, Sungur A, Özalp T. <i>Nebulized Methylene Blue as an Anti-Pruritic Treatment Modality in Dogs with Atopic Dermatitis.</i>	41-45
<i>Derlemeler / Review Articles</i>	
❖ Erdoğan H, Tendar İ, Özalp T, Erdoğan S, Ural S. <i>Köpeklerde Fukosidozis: Güncel Tedavi Yöntemleri ve Araştırma Perspektifleri.</i>	46-52



Tekrarlayan ve Kronik Giardiazisli Kedilerde Fekal Mikrobiyota Transplantasyonu: Hedefe Yönelik Sağaltım

 Kerem URAL¹ ✉

¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Aydın/Türkiye

◆ Geliş Tarihi/Received: 08.02.2025

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 14.02.2025

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2025

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Ural K. Tekrarlayan ve Kronik Giardiazisli Kedilerde Fekal Mikrobiyota Transplantasyonu: Hedefe Yönelik Sağaltım. Bozok Vet Sci (2025) 6, (1):1-7.

Özet: Giardiazis hem insanlar hem de hayvanlar için önemli ölçüde sağlık açısından tehlikeli bir sorun teşkil eder. Zoonotik *Giardia* türlerine ev sahipliği yapma riski bulunan kedi giardiazisi için sınırlı tedavi seçenekleri vardır. Mevcut çalışma, kedilerde tekrarlayan ve kronik giardiazis hastalarına fekal mikrobiyota transplantasyonu (FMT) ile olası doğal ve tam bir tedavi sağlamayı amaçlamaktadır. Bu amaçla, *G. duodenalis* dışkı antijenleri (immünokromatografik), dışkı kisti/trofozoitleri (mikroskopik olarak flotasyon yoluyla) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile gelişmiş tanısal fayda tüm çalışma boyunca mevcut kabul edilmiştir. Bu çalışma 2014-2024 yılları arasında 10 yıllık dönemi kapsamakta olup, giardiazisli kedilerde FMT etkinliğini saptanması amaçlanmıştır. Çalışmaya dâhil edilen 11 kedide ilişkili tanısal testlerle kronikleşen giardiazis tanısı konuldu. Usulüne uygun FMT olgu bazında 1-3 kez uygulandı. Kist skorları sağaltım öncesi 2-4 arasında değişirken (4 olguda en yüksek kist skoru olan 4 puan tespit edildi), FMT ile sağaltım sonrası mukayeseli değerlendirmede 0 ile 2 arasında (en yüksek kist skoruna sahip 4 olgudan 3'ünde 1, 1'inde 0 olarak) saptandı. 11 olgunun 7'sinde FMT sonrası kist skorları 0 idi. Çalışma başlangıcında kist sayımlarına ilişkin skorlamalarda ortalama değer (3.0) ile FMT sonrası ortalama değer (1.0) arası istatistiksel farklılığın ($p=0.005$) bulunması sağaltım başarısı ile ilişkilendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Giardiazis, Fekal Mikrobiyota Transplantasyonu, Kedi, Kronik

Fecal Microbiota Transplantation in Cats with Recurrent and Chronic Giardiasis: Targeted Therapy

Abstract: Giardiasis poses a significant health risk for both humans and animals. There are limited treatment options for feline giardiasis, which has the risk of harboring zoonotic *Giardia* species. The present study aims to provide a possible natural and complete treatment for recurrent and chronic giardiasis patients in cats with fecal microbiota transplantation (FMT). For this purpose, improved diagnostic utility with *G. duodenalis* fecal antigens (immunochromatographic), fecal cysts/trophozoites (microscopically by flotation) and polymerase chain reaction was assumed to be present throughout the study. This study covers a 10-year period between 2014 and 2024 and aims to determine the efficacy of FMT in cats with giardiasis. Chronic giardiasis was diagnosed in 11 cats included in the study with relevant diagnostic tests. Appropriate FMT was applied 1-3 times on a case-by-case basis. While cyst scores varied between 2-4 before treatment (the highest cyst score was 4 in 4 cases), in the comparative evaluation after treatment with FMT, they were between 0 and 2 [3 out of 4 cases with the highest cyst score were 1 and 1 was 0]. Cyst scores after FMT were 0 in 7 out of 11 cases. The statistical difference ($p=0.005$) between the median value (3.0) and the median value (1.0) after FMT in the scores regarding cyst counts at the beginning of the study can be associated with the success of treatment.

Keywords: Cat, Chronic, Giardiasis, Fecal microbiota, Transplantation

1. Giriş

Giardiazis, birinci basamak tedavi protokolleri ile kolay tedavi edilebilen bir hastalık olarak görülse de enfeksiyondan kaynaklanan veya onu takip eden uzun süreli semptomlar yönetimi güçleştirmektedir. Gastrointestinal ve genel durum bozukluğu semptomlarının tekrarlaması; yeniden enfeksiyondan, bağırsak mukozasındaki hasardan, tedavi başarısızlığından veya enfeksiyon sonrası sendromlardan kaynaklanabilmektedir. Kronik giardiazis tedavi başarısızlığında gelişebilmekte ve semptomatik veya asemptomatik karakterde olabilmektedir. Sağaltım etkinliğinin değerlendirilmesi için, ardışık üç dışkı örneğinden kist saptanmaması yeterli görülmele birlikte

bazen duodenal aspiratların incelenmesi veya trofozoitler için biyopsi yapılması da önerilen tanısal metotlardır. Özellikle asemptomatik olabilen düşük seviyeli enfeksiyonlarda, artan giardia yüküne veya başka bir intestinal patojenin sinerjistik etkisine bağlı olarak hastalık tablosu gelişebileceğinden; bu tanısal değerlendirilmeler göz ardı edilmemelidir (1). İnsanlar arasında sıklıkla tartışılan bu konu, bu makalenin yazarlarının görüşlerine göre veteriner hekimliğinde yeterince gündeme getirilmemiştir.

Bu çalışma 2014-2024 yılları arasında 10 yıllık dönemi kapsamakta olup, yazarın FMT uygulamaları ile tecrübesi çok daha da eski tarihlere uzanmaktadır. Aslında prospektif planlanan çalışma, vaka sayısının yıllara dağılımı (sadece bu

konu özelinde retrospektif arşiv), çalışmaya dahil edilme kriterleri, parazitolojik yoklamada uzman varlığı (A.A.), hasta sahibi onam formu, etik kurul izinleri ile hasta takibinde veteriner hekim dışı zorluklar nedeniyle retrospektif olarak değerlendirmeye alınmıştır.

2. Gereç ve Yöntem

2.1. Klinik İzlem

Enfekte olduğu belirlenen kedilerde post-infeksiyöz 10 gün boyunca günlük olarak gözlemlendi ve ilişkili değişkenler ile laboratuvar verileri değerlendirildi. Dışkılar günlük olarak toplandı ve dışkı kıvamı 0 (normal kıvam) veya 1 (yumuşak veya sulu kıvam) olarak puanlandı. Çalışmaya dahil edilen 11 kedide her iki cinsiyetten (7 erkek, 4 dişi), farklı ırklardan (3 British Short Hair, 2'şer İran ve Ankara, 1'er Van, Scottish Fold, Ragdoll ve Sfenks) ve çeşitli yaş gruplarından (9 ay-7 yaş) teşekkül edildi. Kedilerin tamamı evde bakılan, beslenen ancak dışarı ile teması olanlar arasındaydı.

2.2. Dışkı Analizi

FMT ve/veya zenginleştirilmiş (zn) FMT uygulamasının tek veya çoklu seansları sırasında, her bireysel kedinin rektumundan 4 çift dışkı örneği doğrudan toplandı ve Giardia kistleri için veteriner parazitoloji uzmanı (A.A.) tarafından incelendi. Temelinde *G. duodenalis* fekal antijenleri immunokromatografik yöntemle, dışkıdaki kist/trofozoitler mikroskopik muayene (flotasyon metodolojisi) ile belirlenirken, üst tanısal doğrulama amacıyla da PZR (A.A.) tercih edildi. Her dışkı örneği, 0.01M fosfat tamponlu salin çözeltisi (pH 7.2) içinde 1:4 oranında seyreltildi ve bir mikroskop lamı üzerine ince bir yayma yapıldı. İn vitro direkt IFA testinde aynı anda Giardia kistlerini ve Cryptosporidium ookistlerini tespit edebilen bir yöntem kullanıldı. Lamlar, üreticinin talimatlarına göre boyandıktan sonra, lam başına kist sayısı floresan mikroskopla sayıldı. Bir kist skoru 0 ile 4 arasında şu şekilde verildi: 0, 0 kist/slayt; 1, 1 ila 250 kist/slayt; 2, 251 ila 500 kist/slayt; 3, > 501 kist/slayt; ve 4, sayılmayacak kadar çok kist (yani, > 100 kist/10X objektif alan) (Tablo 1). Önceki her 2 çalışma baz alınarak (2,3) kist sayımları dahilinde ilişkin skorlamalar yapıldı. Aşağıda tablo 1'de sunuldu.

Tablo 1. Giardia kist sayımlarına ilişkin skorlama.

Kist	0	1	2	3	4
skoru					
	0	1 ila 250	251 ila	> 501	Sayılmayacak
	kist/slayt	kist/slayt	500	kist/slayt	kadar çok kist
			kist/slayt		(yani, > 100
					kist/10X
					objektif saha)

2.3. İstatistiksel Analizler

Tüm istatistikle ilişkili veri setinde SPSS İstatistik 16.0 kullanıldı. Veri setinin non-parametrik dağılımına istinaden sağaltım öncesi (0. gün) ile FMT sağaltımı sonrası (10. günlerde) karşılaştırmalı kist skorlarının değerlendirilmesine yönelik olarak Wilcoxon İşaretli Sıra Testi kullanıldı. Eşleştirilmiş örneklem karşılaştırılmasında, farklılıklar arası dağılım normalite beklentilerini karşılamadığında, uygunluk açısından bu test tercih edildi.

2.4. Fekal Mikrobiyota Transplantasyonu

Sağlıklı olduğu bilinen, Felin Dermatoloji Grubu ile İntestinal Permeabilite Ölçüm Merkezi arşivlerinde yer alan mikrobiyota analizleri evvelden gerçekleştirilmiş ve kriterlerimizi karşılayan (düşük glisemik indeksle beslenme, mümkün olan en düşük seviyede karbohidrat ile beslenmesi idame ettirilen, anti-paraziter mücadelesi eksiksiz uygulanan, son 3 ay içerisinde klinik ziyaretinde bulunmadığı tespit edilerek, antibiyotik ya da immunsupresif vb. herhangi bir ilaç kullanılmamış olan) donörler arasından seçilen yaş eşleştirmesi yapılmış kedi dışkıları kullanıldı.

Önceden aynı araştırmacı grubumuzdan isimlerinde bulunduğu ve imza attıkları çalışma yöntem kısmı dikkate alınarak (4) mikrobiyota analizleri bilinen ve donör olarak kullanılacak kedilerde standart olarak maksimum gr dışkı temin edildi. Öncelikli olarak elde edilen dışkının çok hızlı şekilde günlük ve tazeliğini korumasına yardımcı olacak şekilde kuru buz aküleri ile sarılarak merkezimize getirilmesi sağlandı. Aynı yaş grubundan kedilerde (donör öncelikli kullanıma tam kan sayımı, serum biyokimyası ve fekal mikroskopik muayene ile sağlıklı olduğu anlaşılan) rektal yolla toplandı. Elde edilen dışkı örneği eşit miktarda izotonik (%0.9'luk NaCl) ile sulandırılarak homojenize edildi ve karıştırıldı. Daha sonra süzgeç yardımı ile katı partiküller uzaklaştırıldı, altta kalan sıvı kısım serum seti yardımı ile rektal yoldan bağırsakta mümkün olduğunca uzak noktaya verildi. Fekal mikrobiyota transplantasyonu (olguların tamamında 1-3'er seans) sonrası belirgin klinik iyileşmeye (Şekil 1 ve 2) dair bulgular (12-48 saat içerisinde) tablo 1'de sunuldu. Olgularda FMT'nin etkinliğinin salt olarak değerlendirilmesi amacı ile başka herhangi bir sağaltım müdahalesi ya da medikal takviyede (klinik bulguların bağırsak mikrobiyotası ile ilişkilendirilmesi hedefi ile) bulunulmadı.

3. Bulgular

Kist skorları sağaltım öncesi 2-4 arasında değişirken (4 olguda en yüksek kist skoru olan 4 puan tespit edildi), FMT ile sağaltım sonrası mukayeseli değerlendirmede 0 ile 2 arasında (en yüksek kist skoruna sahip 4 olgudan 3'ünde 1, 1'inde 0 olarak) saptandı. 11 olgunun 7'sinde FMT sonrası kist skorlarının 0 olması dikkat çekti (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışmaya dahil edilen 11 kronik giardiazisli kedide kist sayımlarına ve skorlarına ilişkin analitik veriler.

Kist sayımına ait analitik veri	Değer
FMT öncesi medyan	3.0
FMT sonrası ortanca	1.0
FMT öncesi ortalama	3.18
FMT sonrası ortalama	0.81
Wilcoxon Test istatistik verisi	0.0
P-değeri	0.005

3.1. Demografik Bulgularla Elde Edilen Sonuçlar

Aşağıda tablo 3’de sunulduğu hali ile tanısıl araçlar, gerçekleştirilen FMT seans sayısı ve tipi ile sağaltım sonucu elde edilen iyileşme ile klinik yansımaları bir arada görülmektedir. Olguların 8’inde hem klinik iyileşme hem de parazitolojik iyileşme bir arada görülürken, diğer 3 olguda yalnızca klinik iyileşme belirgindi. Burada belirleyici unsur sağaltım etkinliğinin değerlendirilmesine yönelik alınan ardışık 3 dışkı örneğinden kist saptanmaması ile PZR negatifliğin bir arada alınması yeterli görüldü.

Tablo 3. Toplu veri akışı ile kümülatif bulguların tezahürü.

Vaka no	Tanı araçları	FMT seansları	Sağaltım sonucu
I	Poc testi, fekal smear, PZR	2 kez znFMT	klly, ply
II	Poc testi, fekal smear, PZR	Tek znFMT	klly, ply
II	Poc testi, fekal smear, PZR	Tek FMT	klly, ply
IV	Poc testi, fekal smear, PZR	Tek znFMT	klly, ply
V	Poc testi, fekal smear	2 kez znFMT	klly, ply
VI	Poc testi, fekal smear	2 kez znFMT	klly, ply
VII	Poc testi, fekal smear	3 kez znFMT	klly
VIII	Poc testi, fekal smear	Tek znFMT	klly, ply
IX	Poc testi, fekal smear	3 kez znFMT	klly
X	Poc testi, fekal smear	2 kez znFMT	klly
XI	Poc testi, fekal smear, PZR	Tek znFMT	klly, ply

klly: klinik iyileşme, ply: parazitolojik iyileşme, PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu, FMT: Fekal mikrobiyota transplantasyonu, znFMT: Zenginleştirilmiş fekal mikrobiyota transplantasyonu (Gut-cumin I ile takviye), Poc:hasta başı hızlı test kiti

4. Tartışma ve Sonuç

Öncelikli olarak tekrarlayan (nüks edici karakterde), kronik giardiazis’in nedenleri üzerinde ve bu minvalde tartışma yerinde olacaktır. İnsanlarda giardiazis vakalarının kronik enfeksiyonlara dönüşmesi konak ve parazit ilişkili faktörlere dayanmaktadır. Başlıca yaş, bağışıklık durumu, beslenme, bağırsak mikrobiyotası ve maruziyet öyküsü konakçı ilişkili faktörlerden iken; genotip, çoğalma hızı, değişken yüzey proteinleri, bağışıklık tepkisinden kaçma yeteneği ve farmasötiklere direnç, parazit ilişkili faktörleri oluşturmaktadır (6,7). Bu makalede yer alan kedilerin tamamında getirilmeden önce (başka hekim eli ile) geçmişte metronidazol kullanımı söz konusu olup, metronidazol direncine ilişkin elde veri olmamasına rağmen, bu konunun araştırılması gerekliliği öne sürülebilir. Aslında usülden de esastan da bu durum göz önünde bulundurularak [önceki medikal geçmişleri] tekrarlayan, kronik, inatçı ve sağaltıma yanıt vermeyen giardiazis olgularında metronidazol ü tek seçenemiş gibi düşünmek doğru gözükmemektedir. Alternatif değil de, başka bir seçenek olarak farklı hayvan türlerinde de denemeleri yapılan (7-9) seknidazol ün kedilerde de olumlu sonuçlar vererek hem klinik iyileşme (klly), hem de parazitolojik iyileşme (ply) ile sonuçlanması kişisel gözlemler doğrultusunda sabittir. Yine de ilaç dirençliliği de göz önünde bulundurulursa bu çalışmada olduğu üzere farklı sağaltım seçeneklerinin yaratılması mühimdir. Nitekim bu çalışma yapılan literatür taramaları ile sabit olduğu üzere FMT ile giardiazis arası ilişkinin kurulduğu önceki bir kedi çalışmaması olmaması yönüyle dikkat çekebilir.

Giardia enfeksiyonuna karşı konak savunması hem immünolojik hem de immünolojik olmayan mukozal süreçleri içermektedir (6). Aralıklı kist saçılımına ilişkin olarak hastalık şiddetinin değişkenliği, kısmi enfeksiyon duyarlılığına ve klinik durumun ciddiyetini de etkileyen konakçının immün durumuna bağlı olabilmektedir (10). Endemik bölgelerde yaşayan çocukların, yetişkinlere göre hastalığa karşı daha hassas olması ve bu tür bölgelerde yaşayanların, bağışık olmayan ziyaretçilere göre daha düşük hastalık insidansı sergileme eğiliminde olması; tekrarlanan veya uzun süreli maruziyetin bir miktar koruma sağladığını düşündürmektedir (11). Mukayeseli değerlendirmede kedilerdeki durum ele alınmalıdır. Giardiazisten etkilenen kedilerde aralıklı küçük, oval formdan gözyaşı-damla yapısında infektif özellikte kistlerin saçılımı söz konusudur (12-14). Söz konusu kistler iki mitotik olarak durgun trofozoitleri içerebilmektedirler. Dışkıda ekskrete edilen kistler; non-infektif, enkiste olmayan trofozoitlerle saçıl maktadır. Ekskrete edilen kistler anlık infektivite edebilmek özelliklerinde olup (12), gastrointestinal kanal dışında da sağkalabilmektedirler (13,14). Bu çalışmada, bu yönü ile aralıklı kist saçılımı olabileceği göz önünde bulundurulduğundan giardiazis teşhisine yönelik olarak hem

mikroskopik muayene hem de Poc testi, fekal smear ile PZR, hasta sahiplerinin ekonomisi dikkate alınarak onam formu dahilinde mümkün olduğunca olgulara uygulandı. Nitekim çalışmanın hemen başlangıcında kist sayımlarına ilişkin skorlamalarda (Tablo 2) ortanca değer (3.0) ile FMT sonrası ortanca değer (1.0) arası istatistiksel farklılığın ($p=0.005$) bulunması sağaltım başarısı ile ilişkilendirilebilir. Yine de ülkemizde genç ya da yaşlı kedilerde giardiazis'in anlık dağılımı ya da prevalansına ilişkin veri eksikliği mevcuttur.

Sağaltıma dirençli, kronik giardiazis mevcudiyetli tek vakalı bir araştırmada enterotoksiste, immün yanıt ve parazit ilaç duyarlılığı ile ilgili bulgulara değişkenlik belirlenmemiştir ancak mononükleer hücrelerin Giardia trofozoitlerini öldürme kapasitesinin azaldığı rapor edilmiştir (15). Hipogammaglobulinemisi olan hastalar gibi bağışıklığı baskılanmış konakçılar, kronik giardiazis predispozisyonu ile ilişkilendirilmektedir (16). Akut ve inatçı giardiazisi olan Hintli çocuklarda anlamlı derecede daha düşük serum IgG ve IgA bildirilirken, asemptomatik taşıyıcılarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırılabilir seviyelerin olmasına ilaveten uygun kemoterapiye rağmen kronik vakaların, akut ve asemptomatik vakalara göre daha düşük konsantrasyonlarda Giardia membran proteinine özgü antikorlara sahip olması ışığında (17); spesifik anti-Giardia immünoglobülinleri üretme yeteneği zayıflığının, kronik giardiazis için bir risk faktörü olduğu bildirilmektedir (1). 2004 yılında Bergen'de laboratuvar tarafından doğrulanmış 1262 vaka ile su kaynaklı bir giardiazis salgınına takiben, hastaların %32'sinde ortalama 7 ay süren kronik giardia enfeksiyonu ortaya çıkmıştır (5,18,19). Bergen salgınından sonra kronik giardiazis ile tanımlanan 40 hastanın, sadece bir tanesinin ölçülemeyen IgA'ya sahip olması (19); kronik giardiazise predispozisyonun tek bir mekanizma veya eksikliğe bağlı değil, her bireyin giardiya karşı savunmasındaki değişen derecelerde yetersizliklerin bir kombinasyonuna dayandığını düşündürmüştür (5). Kedilerde giardiazise karşı şekillenebilen immün yanıt halen tam olarak aydınlatılamasa da, diğer hayvan türlerinde ya da insanlarda bu enfeksiyona karşı cevaben oluşagelen hücresel bağışıklık ve IgA teşekkülünün benzer olabileceği öne sürülmektedir (20). Bu çalışmada mukozal immünite değerlendirilemediği de, sonraki planlar içerisinde yer alacak, IgA ölçülerek değerlendirilmediği bulunulması tesis edilecektir.

Parazitin ortadan kaldırılmasıyla başarılı bir giardiazis tedavisi, mutlaka semptomların sona ermesi anlamına gelmemektedir. Giardiazis, mukozal yapıda değişiklikler ve hasar oluşturmasıyla; başarılı parazitler eradikasyonunun ardından semptomların devamına neden olabilmektedir. Özellikle uzun süreli giardiazis enfeksiyonu sırasında bağırsak epitel fırça kenarlarında hasar, villöz düzleşme/atrofi, mukozal inflamasyon ve bağırsak geçirgenliğinde artış meydana gelebilmektedir (21). Bu patolojiye ilişkin olarak Bergen salgın kohortunda,

abdominal semptomları olan Giardia-negatif vakalarda uzun süreli mukozal inflamasyon gözlemlenmiştir (18). Giardiyazis epitelyal fırça kenar hasarı ve disakkaridaz eksiklikleri nedeniyle disakkaritlerin, özellikle de laktozun parçalanamamasına bağlı olarak; glikoz, sodyum ve suyun malabsorpsiyonuna ve ardından diyareye neden olabilmektedir (1,22). Bu durum CD8+ T hücrelerinin aracılık ettiği, genellikle giardiazis sonrasında görülen geçici laktoz intoleransı ile ilişkilendirilmektedir (23). Mevcut ve geçirilen giardiazis ilişkili meydana gelen bakteriyel aşırı çoğalma, uzun süreli malabsorpsiyon sendromuna sebep olmasıyla; giardiazis tedavisinden sonra görülen semptomların olası nedenleri arasında yer almaktadır (1). Malabsorpsiyonu mevcut uzun süreli giardiazis vakalarında enterobakterilerle bağırsak kolonizasyonu belirlenmiştir (24). Bergen salgınına takiben kalıcı semptomları olan hastalarda yapılan laktuloz nefes testleri, uzun süreli semptomlardan sorumlu olmayan bakteriyel aşırı çoğalmayı göstermiştir (25). Bunu doğrular mahiyette her ne kadar bu çalışma kapsamına alınmasa da, giardiazisli kedilerde laktuloz nefes testi sonrası yüksek hidrojen ve metan değerleri ile karşılaşmamız bunu doğrular mahiyettedir.

Tedaviye dirençli giardiazis global bir sorun olma özelliğini kazanabilir. Tedavi başarısızlığı, tedavinin tamamlanmasından bir hafta sonra bir Giardia-pozitif dışkı örneği ile doğrulanırsa, ilaç direnci varsayılmalıdır. Fakat özellikle endemik bölgelerde yeniden enfeksiyon da göz ardı edilmemelidir (1). Giardiyazis tedavisinde yaygın olarak kullanılan tüm ilaç sınıfları için klinik ve in vitro direnç belgelenmiştir (26,27). Giardia'nın metranidazol tedavisine karşı 50 yıllık duyarlılığı yerini artan dirence bırakmıştır (28). Klinik olarak metranidazol dirençli Giardia'nın, düşük prevalanslı ortamlarda son zamanlarda iyi bir şekilde belgelendiği görülmüştür (29-31). Giardia'daki direnç mekanizmaları üzerine yapılan çalışmaların çoğu, esas olarak metronidazol'e odaklansa da nitazoksanit, albendazol, furazolidon ve kinakrin başta olmak üzere birçok ilaca karşı direnç mekanizmaları da araştırılmıştır (32). Laboratuvar hatlarında, özellikle nitro bileşikler arasında bir dereceye kadar çapraz direncin yaygın olduğuna dair iyi kanıtlar mevcuttur (32,33). Birkaç kanıt dizisi, transkripsiyon sonrası ve translasyon sonrası değişiklikler dahil olmak üzere dirençli izotiplerdeki geniş ve değişken adaptif tepkileri vurgulamaktadır (34-36). Dirençli laboratuvar hatlarında glikoliz, elektron taşınması, antioksidan ve asetilasyon yollarında çok çeşitli metabolik adaptasyonlar gözlemlenmiştir (34). Bunu doğrulayan diğer çalışmalar da direnci transkripsiyonel plastisiteye ve in vitro seçilmiş metronidazol ve nitazoksanide dirençli hatlar kullanılarak oksidoredüktazların aktivitesinin azalması da dâhil olmak üzere geniş metabolik değişikliklere atfetmektedir (34,36). Bu çalışmaya dâhil edilen kedilerin metronidazol geçmişi bulunsada, elde dirençliliğe ait veri bulunmamaktadır.

Giardia trofozoitlerindeki direnç özelliklerinin geliştirilmesi/seçilişinin yanı sıra, tekrarlanan enfeksiyon, uygunsuz ilaç uygulaması ve immünolojik durum dahil olmak üzere klinik tedavi başarısızlıklarıyla çeşitli nedenler ilişkilendirilmiştir (37). Konakçı ve parazitten bağımsız olarak, etkisiz tedavinin bir nedeni, bağırsak mikrobiyotasındaki diğer mikroorganizmalarla birlikte enfeksiyon veya bunların seçilimi olabilmektedir. Bunlardan bazıları, metabolik inaktivasyon yoluyla ilacı etkisiz hale getirebilmektedir (28). Bağırsakta yaşayan çeşitli mikroorganizmalar (örneğin; *Enterococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.* ve *Escherichia coli*), metronidazolü etkisiz hale getiren tip I oksijene duyarız nitroredüktazları kodlayabilmektedir (38). Giardiazisli birkaç fare modelinde, Firmicutes (*Clostridium spp.* dahil) ve *Bacteroides spp.*'de göreceli bir artış (39) veya Protobacteria'da bir artış (40) veya *Enterococcus spp.* ve enterobakteriler lehine *Lactobacillus spp.* miktarında bir azalma (41), gözlemlenmiştir. Yukarıda sözünü edilen literatürlerle elde edilmiş tüm bulgular, bu çalışmada elde edilen başarıyı açıklayabilir. Nitekim tablo 3'de sunulduğu hali ile, bu çalışmada FMT ile elde edilen sağaltım başarısı dahilinde 11 kedinin 8'inde hem klıy hem de pıy saptanması (alınan ardışık 3 dışkı örneğinden kist saptanmaması ile PZR negatifliği); FMT'nin konakçı mikrobiyomunu değiştirerek disbiyozisin önüne geçilmesi sayesinde patojen mikroorganizma-parazit sinerjisinin ve muhtemel olumsuz bazı yolların olumlu yönde etkileşimine yol açmış olabilir. Nitekim ilerleyen paragraflarda FMT'nin etkisi daha detaylı tartışılacaktır.

Probiyotiklerin kullanımı, düşük toksisite ve konakçı bağışıklık sistemi üzerindeki uyarıcı etki nedeniyle, anti-giardiya farmakoterapiye alternatif olarak veya bununla kombinasyon halinde değerlendirilmiştir (42). *Enterococcus faecium* veya *Lactobacillus casei*, Giardia ile enfekte gerbillerde dışkıdaki kist miktarını önemli ölçüde azaltarak, mukozal yüzeye trofozoit yapışmasını azaltabildiği veya önleyebildiği bildirilmektedir (43,44). Bir murin enfeksiyon modelinde albendazol ile kombinasyon halinde *L. casei*'nin önemli bir sinerjistik aktivitesi rapor edilmiştir (45). İnsan giardiazis vakalarında, probiyotik maya *Saccharomyces boulardii*'nin uygulanması, metranidazol monoterapisine kıyasla metranidazol aktivitesini arttırmıştır (46). Probiyotik bakterilerin anti-giardiya aktivitesi, özellikle *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus plantarum*'dan gelen bakteriyosinler gibi belirli toksik peptidlerin salınımına (47) ve *Lactobacillus johnsonii* ile diğer laktobasillerden gelen safra tuzu hidrolazları gibi parazit için toksik olan dekonjuge safra tuzları üreten enzimlere atfedilmiştir (48,49). Yüksek safra tuzu hidrolazı üreticisi *Lactobacilli*'nin veya saflaştırılmış rekombinant safra tuzu hidrolazının deneysel olarak Giardia ile enfekte olmuş neonatal farelere uygulanmasının parazit temizliğini teşvik ettiği bildirilmektedir (48). Bu çalışmada FMT süspansiyonu içerisinde yer aldığı düşünülen doğal konakçı probiyotik

türleri yine anti-giardiya etkinlik sağlamış olabilir. Her ne kadar bu çalışmada mikrobiyom analizleri gerçekleştirilememiş olsa da, elde edilen sağaltım başarısını açıklamaya katkıda bulunabilir.

Çalışmamızın asıl konusu olan FMT'ye yönelik olarak giardiazis'e karşı elde edilen etkinliğe ait mekanizmaların tartışılması yerinde olacaktır. Yine etki mekanizmasına yönelik yapılabilecek açıklamalardan birisi de, mevcut burada yazılan/yayımlanan bu makale daha önce gerçekleştirilmesine karşın, hemen öncesinde yayınlanan çok taze bir başka araştırmadan bahis etmek yerinde olacaktır. Protozoer enfeksiyona neden olan *G. duodenalis*'in FMT ile mualemesi sonrası bağırsak mikrobiyomunda inflamatuvar durumun azalması, pro-inflamatuvar sitokin seviyelerinde düşüş kayda değer sonuçlar arasındadır (50).

İntestinal paraziter hastalıklar (örneğin. *Entamoeba histolytica* tarafından oluşturulan amoebik kolitis/ameobik karaciğer apsasyonu veya *G. duodenalis* enfeksiyonuna ilişkin intestinal giardiazis) esnasında söz konusu parazitlerin intestinal bakterilerle etkileşimi hem paraziter hem de bakteriyel patogenezi etkilemektedir (39,51-53). *Bacteroides*, *Clostridium* ve *Lactobacillus* türlerinde bağıl bollukta azalma, *Bifidobacterium*'da artma amoebik kolitisle ilişkilendirilirken (51), yine amoebik ishalde *Prevotella copri* bağıl bolluğunda artış tespit edilmiştir (52).

İlaç direnci şekillendiğinde farklı bir ilaç sınıfı kullanılması, kombinasyon tedavisi, aynı tedavinin uzun bir süre veya daha yüksek bir dozda tekrarlanması faydalı olabilecek tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır (1). İn vitro direnç her zaman klinik tedavi yanıtıyla ilişkili olmayabilir ve in vitro duyarlılık testi genellikle mevcut değildir. Bu nedenle, anti-giardiya ilaçlar arasındaki hem sinerjistik etkilere hem de çapraz dirence ilişkin klinik ve in vitro kanıtlara dayanarak, tedaviye dirençli vakalarda farklı sınıflardan ilaçların bir kombinasyonunun kullanılması önerilmektedir (27).

5. Sonuç

Çalışmada yukarıda da sözü edilerek, literatür tartışması dahilinde etki mekanizmaları detaylıca tartışıldığı üzere, FMT kronik giardiasisli kedilerde yeni bir sağaltım umudu olabilir. Nitekim FMT ile kist sayımlarına ilişkin skorlamalarda (Tablo 2) elde edilen hem klinik hem de parazitolojik başarı sağaltım protokollerinde değişimin habercisi olabilir.

Kaynaklar

1. Robertson LJ, Hanevik K, Escobedo AA, Mørch K, Langeland N. Giardiasis—why do the symptoms sometimes never stop?. *Trends in Parasitology* 2010; 26 (2): 75-82.
2. Chon SK, Kim NS. Evaluation of silymarin in the treatment on asymptomatic Giardia infections in dogs. *Parasitology Research* 2005; 97: 445-51.
3. Scorza AV, Radecki SV, Lappin MR. Efficacy of a combination of febantel, pyrantel, and praziquantel for the treatment of kittens experimentally infected with Giardia species. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2006; 8: 7-13.
4. Ural K, Erdoğan H, Adak Hİ, Ateş DS, Kahraman D. Ataksik kedilerde fekal mikrobiyota transplantasyonu. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University* 2019; 4(1) :34-36.
5. Robertson LJ, Hermansen L, Gjerde BK, Strand E, Alvsøvg JO, Langeland N. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; 72(3): 2212-7.
6. Roxström-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svärd SG. Giardia immunity—an update. *Trends in Parasitology* 2006; 22(1): 26-31.
7. Aliç Ural D, Ayan A, Aysul N, Balıkcı C, Ural K. Secnidazol treatment to improve milk yield in sheep with giardiasis. *Atatürk University Veterinary Science Journal* 2014; 9(2): 74-82.
8. Aliç Ural D, Erdoğan H, Toplu S, Ayan A. Oğlaklarda Giardiasis kontrolüne yönelik oral klinoptilolit uygulaması. *Kocatepe Veterinary Journal* 2017; 10(3): 158-63.
9. Ural K, Aysul N, Voyvoda H, Ulutaş B, Aldemir OS, Eren H. Single dose of secnidazole treatment against naturally occurring Giardia duodenalis infection in Sakiz lambs. *Revista MVZ Córdoba* 2014; 19(1): 4023-32.
10. Faubert GM. The immune response to Giardia. *Parasitology Today* 1996; 12: 140-5.
11. Istre GR, Dunlop TS, Gaspard GB, Hopkins RS. Waterborne giardiasis at a mountain resort: evidence for acquired immunity. *American Journal of Public Health* 1984; 74(6): 602-4.
12. Barr SC. Enteric protozoal infections. In: Greene CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2006. p. 736-42.
13. Janeczko S, Griffin B. Giardia infection in cats. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 2010; 32(8): E4.
14. Uchôa FFD, Sudré AP, Macieira DDB, Almosny NRP. The influence of serial fecal sampling on the diagnosis of giardiasis in humans, dogs, and cats. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2017; 59: e61.
15. Smith PD, Gillin FD, Spira WM, Nash TE. Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production, and host immune response. *Gastroenterology* 1982; 83(4): 797-803.
16. Oksenhendler E, Gérard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, et al. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46(10): 1547-54.
17. Khanna R, Nain CK, Mehta S, Vinayak VK. Depressed humoral immune responses to surface antigens of Giardia lamblia in persistent giardiasis. *Pediatric Infectious Disease Journal* 1988; 7(7): 492-7.
18. Hanevik K, Hausken T, Morken MH, Strand EA, Mørch K, Coll P, et al. Persisting symptoms and duodenal inflammation related to Giardia duodenalis infection. *Journal of Infection* 2007; 55(6): 524-30.
19. Mørch K, Hanevik K, Robertson LJ, Strand EA, Langeland N. Treatment-ladder and genetic characterisation of parasites in refractory giardiasis after an outbreak in Norway. *Journal of Infection* 2008; 56(4): 268-73.
20. Boucraut-Baralon and ABCD colleagues. GUIDELINE for Giardiasis. [Internet]. 2013. Available from: <https://www.abcdcatsvets.org/guideline-for-giardiasis/?pdf=5262>.
21. Di Prisco MC, Hagel I, Lynch NR, Jimenez JC, Rojas R, Gil M, et al. Association between giardiasis and allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 1998; 81(3): 261-5.
22. Buret AG. Pathophysiology of enteric infections with Giardia duodenalis. *Parasite* 2008; 15: 261-5.
23. Scott KGE, Yu LC, Buret AG. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infection and Immunity* 2004; 72(6): 3536-42.
24. Tomkins AM, Wright SG, Drasar BS, James WPT. Bacterial colonization of jejunal mucosa in giardiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1978; 72(1): 33-6.
25. Morken MH, Nysaeter G, Strand EA, Hausken T, Berstad A. Lactulose breath test results in patients with persistent abdominal symptoms following Giardia lamblia infection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2008; 43(2): 141-5.
26. Farthing MJ. Giardiasis. *Gastroenterology Clinics of North America* 1996; 25: 493-515.
27. Upcroft P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14: 150-64.
28. Lalle M, Hanevik K. Treatment-refractory giardiasis: challenges and solutions. *Infection and Drug Resistance* 2018; 1921-33.
29. Gutiérrez JM, Aldasoro E, Requena A, Comin AM, Pinazo MJ, Bardají A, et al. Refractory giardiasis in Spanish travellers. *Travel Medicine and Infectious Disease* 2013; 11(2): 126-9.
30. Nabarro LEB, Lever RA, Armstrong M, Chiodini PL. Increased incidence of nitroimidazole-refractory giardiasis at the Hospital for Tropical Diseases, London: 2008-2013. *Clinical Microbiology and Infection* 2015; 21(8): 791-6.
31. Requena-Méndez A, Goñi P, Rubio E, Pou D, Fumadó V, Lóbez S, et al. The use of quinacrine in nitroimidazole-resistant Giardia duodenalis: an old drug for an emerging problem. *Journal of Infectious Diseases* 2017; 215(6): 946-53.
32. Leitsch D. Drug resistance in the microaerophilic parasite Giardia lamblia. *Current Tropical Medicine Reports* 2015; 2: 128-35.
33. Tejman-Yarden N, Millman M, Lauwaet T, Davids BJ, Gillin FD, Dunn L, et al. Impaired parasite attachment as fitness cost of metronidazole resistance in Giardia lamblia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; 55(10): 4643-51.
34. Emery SJ, Baker L, Ansell BR, Mirzaei M, Haynes PA, McConville MJ, et al. Differential protein expression and post-translational modifications in metronidazole-resistant Giardia duodenalis. *Gigascience* 2018; 7(4): giy024.
35. Leitsch D. A review on metronidazole: an old warhorse in antimicrobial chemotherapy. *Parasitology* 2019; 146(9): 1167-78.

36. Müller J, Ley S, Felger I, Hemphill A, Müller N. Identification of differentially expressed genes in a *Giardia lamblia* WB C6 clone resistant to nitazoxanide and metronidazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 62(1): 72-82.
37. Nash TE, Ohl CA, Thomas E, Subramanian G, Keiser P, Moore TA. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clinical Infectious Diseases*. 2001;33(1):22-8.
38. Halliez MC, Buret AG. Extra-intestinal and long-term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World Journal of Gastroenterology* 2013; 19(47): 8974.
39. Beatty JK, Akierman SV, Motta JP, Muise S, Workentine ML, Harrison JJ, et al. *Giardia duodenalis* induces pathogenic dysbiosis of human intestinal microbiota biofilms. *International Journal of Parasitology* 2017; 47(6): 311-26.
40. Barash NR, Maloney JG, Singer SM, Dawson SC. *Giardia* alters commensal microbial diversity throughout the murine gut. *Infection and Immunity* 2017; 85(6): 10-1128.
41. Pavanelli MF, Colli CM, Gomes ML, Góis MB, de Melo GDAN, de Almeida Araújo EJ, et al. Comparative study of effects of assemblages AII and BIV of *Giardia duodenalis* on mucosa and microbiota of the small intestine in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018; 101: 563-71.
42. Vitetta L, Saltzman ET, Nikov T, Ibrahim I, Hall S. Modulating the gut micro-environment in the treatment of intestinal parasites. *Journal of Clinical Medicine* 2016; 5(11): 102.
43. Benyacoub J, Perez PF, Rochat F, Saudan KY, Reuteler G, et al. *Enterococcus faecium* SF68 enhances the immune response to *Giardia intestinalis* in mice. *Journal of Nutrition* 2005; 135(5): 1171-6.
44. Shukla G, Devi P, Sehgal R. Effect of *Lactobacillus casei* as a probiotic on modulation of giardiasis. *Digestive Diseases and Sciences* 2008; 53: 2671-9.
45. Shukla G, Kaur H, Sharma L. Comparative therapeutic effect of probiotic *Lactobacillus casei* alone and in conjunction with antiprotozoal drugs in murine giardiasis. *Parasitology Research* 2013; 112: 2143-9.
46. Besirbellioglu BA, Ulcay A, Can M, Erdem H, Tanyuksel M, Avci IY, et al. *Saccharomyces boulardii* and infection due to *Giardia lamblia*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2006; 38(6-7): 479-81.
47. Amer EI, Mossallam SF, Mahrous H. Therapeutic enhancement of newly derived bacteriocins against *Giardia lamblia*. *Experimental Parasitology* 2014; 146: 52-63.
48. Allain T, Chaouch S, Thomas M, Travers MA, Valle I, et al. Bile salt hydrolase activities: a novel target to screen anti-*Giardia lactobacilli*?. *Frontiers in Microbiology* 2018; 9: 89.
49. Travers MA, Sow C, Zirah S, Deregnacourt C, Chaouch S, Queiroz RM, et al. Deconjugated bile salts produced by extracellular bile-salt hydrolase-like activities from the probiotic *Lactobacillus johnsonii* La1 inhibit *Giardia duodenalis* in vitro growth. *Frontiers in Microbiology* 2016; 7: 1453.
50. Partida-Rodríguez O, Brown EM, Woodward SE, Cirstea M, Reynolds LA, Petersen C, et al. Fecal microbiota transplantation from protozoa-exposed donors downregulates immune response in a germ-free mouse model, its role in immune response and physiology of the intestine. *PLoS One* 2024; 19(10): e0312775.
51. Verma AK, Verma R, Ahuja V, Paul J. Real-time analysis of gut flora in *Entamoeba histolytica* infected patients of Northern India. *BMC Microbiology* 2012; 12: 183.
52. Gilchrist CA, Petri SE, Schneider BN, Reichman DJ, Jiang N, Begum S, et al. Role of the gut microbiota of children in diarrhea due to the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Journal of Infectious Diseases* 2016;213(10): 1579-85.
53. Bartelt LA, Bolick DT, Mayneris-Perxachs J, Kolling GL, Medlock GL, Zaenker EI, et al. Cross-modulation of pathogen-specific pathways enhances malnutrition during enteric co-infection with *Giardia lamblia* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens* 2017; 13(7): e1006471.



Fırın Et Yemeklerine Alüminyum Gıda Tepsilerinden Olası Alüminyum Migrasyonunun Belirlenmesi*

Sabure Özlem BİLİCİ ¹, Adalet DIŞHAN ², Zafer GÖNÜLALAN ¹✉

¹ Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri/Türkiye

² Yozgat Bozok Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Yozgat/Türkiye

◆ **Geliş Tarihi/Received:** 16.02.2025

◆ **Kabul Tarihi/Accepted:** 22.02.2025

◆ **Yayın Tarihi/Published:** 30.06.2025

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Bilici SÖ, Dışhan A, Gönülalan Z. Fırın Et Yemeklerine Alüminyum Gıda Tepsilerinden Olası Alüminyum Migrasyonunun Belirlenmesi. Bozok Vet Sci (2025) 6, (1):8-15.

Özet: Bu çalışmada, fırınlardan toplanan alüminyum tepsilerde pişirilen et yemeği örneklerinde alüminyum, krom, demir, bakır, çinko elementleri açısından ağır metal migrasyonunun araştırılması amaçlandı. Kayseri'nin Bünyan, Sarioğlu, Pınarbaşı, Sarız, Yahyalı, Develi, Yeşilhisar, Talas, Melikgazi ve Kocasinan ilçelerinden 41 fırın et yemeği örneği materyal olarak kullanıldı. Ayrıca, deneysel olarak alüminyum migrasyonunu incelemek için dokuz et yemeği örneği alüminyum folyo, porselen ve cam kaplarda 150, 180 ve 200 °C'de pişirilerek hazırlandı. Tüm numuneler, çözünürleştirme işleminin ardından ICP-MS ile analiz edildi. Sonuçlar, alüminyum folyo kaplarda 200 °C'de 30 dk. pişirilen et yemeğinde, 2,924±0,107 mg/kg alüminyum bulunduğunu gösterdi. Haftalık olarak 70 kg'lık bir birey için kabul edilebilir alüminyum maruziyeti için üst limitin 140 mg olduğu göz önüne alınırsa, bu yemeklerin düzenli tüketimiyle sınırın aşılabileceği ve sağlık açısından tehdit oluşturabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal, Alüminyum, Migrasyon, Sıcaklık, Ambalaj

Determination Of Possible Aluminium Migration from Aluminium Food Trays to Oven Meat Dishes

Abstract: In this study, the aim was to determine the migration of heavy metals, specifically aluminum, chromium, iron, copper, and zinc, in meat dishes cooked in aluminum trays collected from bakeries. A total of 41 oven-cooked meat samples were collected from the districts of Bünyan, Sarioğlu, Pınarbaşı, Sarız, Yahyalı, Develi, Yeşilhisar, Talas, Melikgazi, and Kocasinan in Kayseri province. Additionally, nine meat dish samples were experimentally prepared by cooking them in aluminum foil, porcelain, and glass containers at 150, 180, and 200 °C to investigate aluminum migration. All samples were analyzed using ICP-MS after a digestion process. The results showed that 2,924±0,107 ppm of aluminum was detected in meat cooked 30 min. at 200 °C in aluminum foil containers. Considering that the upper limit for acceptable aluminum exposure for a 70 kg individual is 140.0 mg on a weekly basis, it was concluded that consumption of these meals exceeding the acceptable limit posed a health threat.

Keywords: Aluminium, Heavy metal, Migration, Package, Temperature

1. Giriş

Özkütlesi yüksek, metal özellikte ve çoğu zaman toksik olan elementler "ağır metal" olarak adlandırılmaktadır ve alüminyum (Al), kurşun (Pb), cıva (Hg), kadmiyum (Cd), demir (Fe), arsenik (As) ve kobalt (Co) bu elementler arasında yer almaktadır (1). Bu metaller su, gıda ve solunum yoluyla vücuda alınarak birikim oluşturur. Vücutta böbrek, akciğer, karaciğer, kemik ve yağ dokularında depolanırken; bir kısmı solunum, safra, dışkı ve idrar yoluyla atılmaktadır. Ancak uzun vadede birikimleri, sağlık üzerinde olumsuz etkilere yol açabilir. Kadmiyum, cıva ve kurşun çok düşük miktarlarda bile toksik etki gösterebilir. Özellikle kadmiyum ve cıvanın 0.001-0.1 ppm konsantrasyonlarında toksisiteye neden olduğu belirtilmiştir (2). Bir ağır metalin organizma

için önemli olup olmadığı, onun biyolojik işlevlerine bağlıdır. Örneğin, nikel bitkiler için toksikken, hayvanlar için eser element olup toksik değildir. Diğer sistemlerde ise toksisite, konsantrasyona bağlı olarak değişkenlik gösterir (3). Alüminyum, ışık geçirmeme, %90 oranında radyasyonu yansıtabilme, düşük elastikiyet katsayısına sahip olma, kolay şekil alma, yüksek ve düşük sıcaklıklara karşı dayanıklılık gibi özelliklerinden ötürü gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (4). Günümüzde alüminyum, süt ve süt ürünleri, kahve, çay, hazır çorba, şekerleme, puding, çerez, unlu mamuller, balık ve et ürünleri, meyve suyu, bira ve şarap gibi birçok ürünün ambalaj ve kapaklarında kullanılmaktadır (5,6). Alüminyum sınırlı derecede korozyona duyarlıdır. Laklanmamış ve 20 µm'den daha ince alüminyum folyolar gözenekli yapıdadır. Bu tür folyolar su buharı ve oksijene

✉: zgonulalan@erciyes.edu.tr

*Bu çalışma ERÜ BAP tarafından desteklenen TYL-2020-9908 kodlu aynı isimli Yüksek Lisans Tezinden özetlenmiştir

karşı hassas gıdalar için uygun değildir. Esnek yapısı nedeniyle, kutuların iç basınca dayanıklılığını artırmak için "Durulamin" (AlCuMg) gibi korozyona dayanıklı alaşımlar kullanılmaktadır. Gıda sektöründe yaygın kullanılan diğer alüminyum alaşımları ise AlMn, AlMg1 ve AlMgSi1'dir (6). İnsanlar alüminyuma diyet veya diyet dışı kaynaklar yoluyla maruz kalmaktadır. Alüminyum tuzları içme suyu arıtımında, gıda ambalajlarında ve flokülant olarak kullanılmaktadır. Ayrıca aşılarda, ilaçlar, kozmetik ürünler, güneş kremleri, deodorantlar ve makyaj malzemeleri gibi birçok üründe de bulunmaktadır (7). Gıda ve Tarım Organizasyonu/Dünya Sağlık Organizasyonu (Food and Agriculture Organization, FAO/ World Health Organization, WHO)'nun ortaklığı ile kurulan Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA), 1989 yılında alüminyumun 7.0 mg/kg vücut ağırlığı için geçici tolere edilebilir haftalık alımını (Provisional tolerable weekly intake, PTWI) belirlemiştir (8). Alüminyumun güvenliği 2007 yılında JECFA tarafından yeniden değerlendirilerek, PTWI'yi kg vücut ağırlığı başına 1.0 mg'a düşürmüştür. Bununla birlikte, JECFA, yeni biyoyararlanım ve toksikolojik verilerin bir sonucu olarak 2011'de PTWI'yi 2.0 mg/kg vücut ağırlığı olarak yenilemiştir (9).

Cıva oda sıcaklığında sıvı halde bulunan, yoğunluğu sudan ve havadan yüksek bir metaldir. Suda çözünmez ve sanayi atıkları ile pestisitler nedeniyle çevrede birikimi artabilir. Cıva, vücut dokularında ciddi değişimlere yol açan çevresel bir toksik kirleticidir (10). İnsanlar çevre kirliliği, kontamine gıdalar, diş dolguları, tıbbi uygulamalar ve endüstriyel işlemler yoluyla cıvaya maruz kalmaktadır. Örneğin, amalgam dolgular uzun süreli cıva maruziyetine neden olarak görme bozuklukları, kas zayıflığı ve Alzheimer gibi hastalıklara yol açabilir (2). Endüstriyel atıkların doğrudan denize bırakılması sonucu balıklar yoluyla insanlara geçen metil cıva, ciddi sağlık sorunlarına neden olmuştur (3).

Krom (III) düşük konsantrasyonlarda esansiyel bir elementtir ve aynı zamanda krom (VI) karsinojen olup yetişkinler için günlük gereksinimin 0.02 ile 0.5 mg/gün arasında olduğu tahmin edilmektedir (11). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA), krom için limiti 13 mg/kg olarak belirlemiştir. Bilimsel Gıda Komitesi (Scientific Committee on Food, SCF) sadece krom için 1 mg/gün'den az olması gereken tolere edilebilir bir üst sınır önermektedir (12). Kodeks Alimentarius Komisyonu (CAC), Gıdalarda izin verilen maksimum krom seviyesini 0.025-0.2 mg/kg olarak belirtmiştir (13).

Kurşun, doğada toprak, su ve bitkilerde bulunur. Sanayi tesisleri ve şehir merkezlerine yakın alanlarda yetişen tahıl, meyve, et ve baklagillerin kurşun içerebildiği bilinmektedir. İnsan vücudu ortalama 125-200 mg kurşun içerir ve günlük 1-2 mg kadarını atabilir. WHO ve Birleşmiş Milletler (BM) tarafından tolere edilebilir haftalık doz 3000 mg olarak belirlenmiştir. Kurşuna maruziyet genellikle kontamine toz,

aerosol, gıda, su ve boyalar yoluyla gerçekleşmektedir (14). Yetişkinler kurşuna %35-50 düzeylerinde içme suyu yoluyla maruz kalırken, çocuklarda bu oran %50'nin üzerine çıkabilir. Kurşun vücutta en çok böbrekte birikir, ardından karaciğer, kalp ve beyin dokularına geçer (10). Kurşun zehirlenmesi sinir sistemini etkileyerek baş ağrısı, dikkat dağınıklığı, sinirlilik, hafıza kaybı ve zihinsel donukluk gibi belirtilerle kendini gösterebilir (14).

Kadmiyum ise doğada saf halde bulunmaz; çinko ve diğer metallerin cevherlerinde yer alır. Kadmiyum içeren kaynaklar arasında su boruları, sigara dumanı, sanayi atıkları, gübreler ve rafine gıdalar bulunmaktadır. İnsan vücudu yaklaşık 40 mg kadmiyum içerir ve günlük olarak bir miktarını atabilir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından tolere edilebilir haftalık doz 7 µg/kg olarak belirlenmiştir. Kadmiyum maruziyeti ileri safhalarda prostat, göğüs ve akciğer kanserleri gibi ciddi hastalıklara yol açabilir. Kadmiyum, solunum, sigara dumanı ve beslenme yoluyla vücuda alınırken, cilt yoluyla emilimi nadirdir (10). Kadmiyumun çevresel etkileri büyük ölçüde, madencilik, eritme, pil, pigment, stabilizatör ve alaşım üretimi gibi sanayi faaliyetlerinden kaynaklanır (15). Ayrıca yapraklı sebzeler, patates, tahıllar, tohumlar, karaciğer, böbrek, kabuklu deniz ürünleri ve deniz yosunu gibi gıdalarda eser miktarda bulunmaktadır. Kadmiyum dolaşım sistemi yoluyla vücutta taşınarak toksisiteye neden olmaktadır.

Besinlerde alüminyum seviyesini belirlemek için fotometrik, titrimetrik, florimetrik ve gravimetrik yöntemler geliştirilmiş olsa da metal iyonlarıyla reaksiyonları nedeniyle analiz zorlaşmaktadır (16). Alüminyum, besinlerde ya doğal hâlde ya da katkı maddeleri yoluyla bulunur (17,18). Bitkisel kaynaklı alüminyum, bitkinin toprak ve sudan emdiği miktara bağlıdır. Çay yaprakları, bazı subtropikal bitkiler ve Güney Amerika sebzeleri yüksek alüminyum emme kapasitesine sahiptir. Hayvansal kaynaklı besinlerde ise alüminyum düzeyleri, hayvanın tükettiği su ve yem içeriğine göre değişir (19).

Ambalaj çeşitlerine bağlı olarak ambalajdan gıdaya madde geçişine migrasyon denmektedir ve geçen madde ise migrant adını almaktadır. Migrasyondan göç eden maddeler bir veya birden fazla kimyevi maddeler içerebilmektedir (20). Eğer bir tane kimyevi madde göç ediyorsa bu migrasyonun ölçülmesi spesifik migrasyon yani spesifik limit olarak bilinmektedir. Birden fazla göç eden kimyevi madde varsa ölçümü toplam grup migrasyonu ile yapılmaktadır. Migrasyon sadece ambalaj gıda yönünde olmayıp gıdadan ambalaj yönüne de migrasyon olmaktadır. Gıda eğer yağlı ve aromalı bir yapıya sahipse gıdadan ambalaja bir migrasyon gerçekleşmektedir. Migrasyon düzeyi çok yüksek olursa ambalajda şişme gibi yapısal bozulmalar meydana gelmektedir.

Bu çalışma kapsamında, migrasyon yolu ile et yemeklerine geçen ağır metallerin farklı sıcaklık ve ambalaj ortamlarındaki düzeylerinin belirlenmesi amaçlandı.

2. Materyal ve Metot

2.1.Fırın Et Yemeği Numunelerinin Toplanması

Kayseri iline ait Bünyan, Sarıoğlu, Pınarbaşı, Sarız, Yahyalı, Develi, Yeşilhisar, Talas, Melikgazi ve Kocasinan ilçelerinden olmak üzere on farklı fırın beşer kez ziyaret edilerek toplamda 50 adet fırın et yemeği numunesi birer hafta aralıklarla Ocak ve Şubat 2020 tarihlerini kapsayan zaman dilimlerinde toplandı ve soğuk zincirde (+4°C) laboratuvara getirildi.

2.2. Deneysel Fırın Et Yemeği Örneklerinin Hazırlanışı

Ağır metal (Al, Cr, Fe, Cu, Zn) geçişini deneysel olarak kıyaslamak amacı ile yerel reçeteye göre hazırlanan, et yemeği; 150, 180, 200 derecelerde pastör fırınında 30 dakika boyunca cam, porselen ve alüminyum folyo kaplarında pişirilerek hazırlandı.

2.3. Numune Çözünürleştirme İşlemi

Çalışmada toplanan et yemeği ve deneysel olarak hazırlanan et yemeği örnekleri ön işlem olarak Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (TAUM)'inde çözünürleştirme işlemine tabi tutuldu.

Sıvı kısmından birer mililitre alınan et yemeği örneği üzerine 2mL HNO₃ ve 3 mL H₂O₂ eklenerek yaş yakma yöntemine göre sıcaklık ve basınç programının uygulanmasıyla mikrodalga (Berghoff, Belçika) kapalı sisteminde çözünürleştirildi. Elde edilen berrak çözeltiler alınarak saf su ile 25 mL' ye seyreltilti.

2.4.Ağır Metallerin ICP-MS ile Tayini

Çözünürleştirilen fırın et yemekleri alüminyum, krom, demir, bakır ve çinko ağır metalleri yönünden analiz edilmeden önce İndüktif Eşleşmiş Plazma - Kütle Spektrometresi (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometer, ICP-MS, Agilent 7500a, ABD) cihazına tanıtmak amacıyla ön işlemlerden geçirildi. Analizi yapılacak elementleri içeren bilinen derişimlerde (0, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ppb) standartlar hazırlandı. Cihazın ölçüm parametreleri, Ataro ve ark. (21)'dan modifiye edilen yöntemlerle uygulanarak kontrol edildi. Performans ayarının sağlanması için cihazdan 200 ppb lityum (Li), ytterbiyum (Yb) ve sezyum (Cs) içeren tune çözeltisi geçirildi.

Cihazın performansı tune çözeltisi ile kontrol edildikten sonra, analizi yapılacak elementleri içeren standartlar belirlenerek cihaza tanıtılmış ve çözünürleştirilip seyreltilen numunelerin analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler sırasında, araştırılan elementlerin dışında, tüm periyodik tabloyu temsilen 200 ppb konsantrasyonunda berilyum (Be), skandiyum (Sc), rodyum (Rh) ve bizmut (Bi) içeren iç standart çözeltisi cihaza verilerek, çözünmüş örnekler ICP-MS ile analiz edilmiştir (21). Tüm analizler, tekrarlı ve iki paralelli olarak gerçekleştirilmiştir.

2.5. İstatistiksel Analiz

Örneklerde ağır metal düzeyleri Anova testi ile ortalamaların arasındaki farklar bakımından incelenmiştir. Farklılıklar Duncan testi ile kontrol edilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS 24.0 programı kullanılmıştır.

3. Bulgular

Alüminyum, 180°C cam materyalde pişirilen örnekte en düşük seviyede (0.456±0.010 ppm) tespit edilirken, 200°C'de alüminyum folyo kaplarda pişirilen örneğe ait değerler (2.924± 0.107 ppm) en yüksek seviye olarak belirlendi.

Porselen, cam ve alüminyum folyo kaplarda deneysel olarak 150, 180, 200°C ısı işlem uygulanan fırın et yemeklerine ait alüminyum miktarları belirtilen ortalama değerler Tablo1'de verildi. Elde edilen sonuçlara göre, analiz edilen örnekler arasında en düşük alüminyum seviyesi 180°C'de cam kapta pişirilen örnekte (0.456±0.010 ppm) belirlenirken, en yüksek seviye 200°C'de alüminyum folyo kaplarda pişirilen örneklerde (2.924±0.107 ppm) tespit edilmiştir. Analiz verilerine uygulanan iki yönlü Anova test ile sıcaklık ve ambalaj faktörlerinin, yemeğe alüminyum geçişi üzerinde etkili olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.05). Duncan testine göre, alüminyum geçişinin en yüksek 200°C'de, takiben 180 ve 150°C'ler uygulanan et yemeklerinde olduğu gözlemlendi. Ambalaj materyalleri arasına yapılan karşılaştırmaya göre, alüminyum geçişin en yüksek düzeyde alüminyum folyo kaplarda pişirilen et yemeklerinde olduğu; porselen ve cam kapların alüminyum migrasyonu bakımından anlamlı düzeyde etkilerinin bulunmadığı gözlemlendi.

Kromun alüminyum folyo materyalde pişirilen et yemeğine geçişi, en yüksek (0.374±0.007 ppm) 180°C'de tespit edilirken, en düşük düzeyi (0.058 ±0.000 ppm) ise 200°C'de belirlendi (Tablo 1).

Veriler, sıcaklık ve ambalaj faktörlerinin krom geçişi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterdi (p<0.05). Duncan testi sonuçlarına göre, krom geçişinin, en yüksek 150 ve 180°C'lerde olduğu belirlendi. Ambalaj materyalleri açısından değerlendirildiğinde, cam kaplarda pişirilen et yemeklerinde krom geçişi en yüksek seviyede ölçüldü; ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05).

Demir migrasyonuna ilişkin analizler sonucunda, en düşük demir seviyesi (0.910±0.086 ppm) 150°C'de porselen kaplarda pişirilen örneklerde, en yüksek seviye ise (2.942±0.008 ppm) 200°C'de alüminyum folyo kaplarda pişirilen örneklerde tespit edildi (Tablo 1). Farklı sıcaklıkların et yemeğine demir geçişi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olduğu belirlendi (p<0.05). Duncan testi sonuçlarına göre, demir geçişi en yüksek 200°C'de gerçekleşirken, 150 ve 180°C'de pişirilen örneklerde daha düşük seviyelerde

gözlemlendi. Ambalaj materyalleri açısından yapılan karşılaştırmada, demir geçişinin en yüksek alüminyum folyo kaplarda gerçekleştiği, ancak porselen ve cam kaplar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ($p>0.05$).

Tablo 1. Farklı ambalaj ve sıcaklıklarda pişirilen fırın et yemeklerinde ait ağır metal konsantrasyonları (ppm).

Ağır Metal	Ambalaj	Sıcaklık (°C)		
		150	180	200
Alüminyum	Porselen	0.661±0.047	0.787±0.018	1.210±0.020
	Cam	0.822±0.025	0.456±0.010	1.127±0.004
	Al	1.407±0.052	2.798±0.054	2.924±0.107
	Folyo			
Krom	Porselen	0.281±0.018	0.370±0.021	0.083±0.000
	Cam	0.333±0.021	0.331±0.002	0.335±0.008
	Al	0.353±0.017	0.374±0.007	0.058
	Folyo			±0.000
Demir	Porselen	0.910±0.086	1.708±0.054	1.900±0.006
	Cam	1.273±0.067	1.193±0.033	1.265±0.065
	Al	1.612±0.071	1.299±0.043	2.942±0.008
	Folyo			
Bakır	Porselen	0.200±0.009	0.239±0.003	0.355±0.002
	Cam	0.170±0.009	0.347±0.019	0.308±0.013
	Al	0.191±0.007	0.309±0.007	0.258±0.004
	Folyo			
Çinko	Porselen	0.323±0.063	0.241±0.021	0.243±0.001
	Cam	0.280±0.040	0.276±0.079	0.209±0.013
	Al	0.319±0.139	0.315±0.030	0.345±0.055
	Folyo			

Bakır miktarı, 150°C’de cam materyalde pişirilen et yemeğinde en düşük seviyede (0.170±0.009 ppm) belirlenirken, 200°C’de porselen kaplarda pişirilen örneklerde en yüksek seviyeye (0.355±0.002 ppm) ulaştığı belirlendi. Deney kapsamında porselen, cam ve alüminyum folyo kaplar kullanılarak 150, 180 ve 200°C sıcaklıklarında pişirilen fırın et yemeklerine ait bakır miktarlarına ait ortalama değerler Tablo 1’te sunulmuştur. İstatistiksel analizler sonucunda, ambalaj faktörünün bakır geçişi üzerinde anlamlı bir etkisinin bulunmadığı ($p>0.05$), ancak sıcaklık faktörünün bakır geçişini etkilediği ($p<0.05$)

belirlenmiştir. Duncan testi sonuçlarına göre, bakır geçişi 180 ve 200°C’de benzer seviyede olup, 150°C’de daha düşük tespit edilmiştir.

Tablo 1’te belirtildiği gibi, çinko miktarı 200°C’de cam kapta pişirilen et yemeğinde en düşük seviyede (0.209±0.013 ppm) tespit edilirken, aynı sıcaklıkta alüminyum folyo kaplarda pişirilen numunede en yüksek seviyede (0.345±0.055 ppm) belirlenmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda, sıcaklık faktörünün çinko geçişi üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı ($p>0.05$), ancak farklı ambalaj malzemelerinin çinko geçişinde belirgin bir farklılık yarattığı belirlendi ($p<0.05$). Duncan testine göre, çinko geçişinin en yüksek alüminyum folyo kaplarda gerçekleştiği, cam ve porselen kaplar arasında ise anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Çalışmamızda incelenen 41 adet fırın et yemeği örneğine ait ağır metal geçişleri (Al, Cr, Fe, Cu, Zn) arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$).

İncelenen 2, 4, 33 ve 39 numaralı örnekler dışında kalan tüm örneklerde, laboratuvar ortamında alüminyum kapta hazırlanan et yemeğinde tespit edilen alüminyum seviyesinin (2.924 ppm) üzerinde değerler belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında analiz edilen 41 fırın et yemeği örneğine ait ağır metal düzeylerinin ortalama değerleri Tablo 2’de sunulmuştur. Duncan çoklu aralık testi sonuçlarına göre, alüminyum seviyeleri 27 farklı grupta sınıflandırılmıştır. En yüksek alüminyum geçişi, 15 numaralı örnekte (11.434±0.042 ppm) tespit edilirken, en düşük seviye 4 numaralı örnekte (1.557±0.112 ppm) gözlemlenmiştir. Krom seviyeleri 24 grupta toplanmıştır. En yüksek krom geçişi 39 numaralı örnekte (0.883±0.019 ppm) olarak saptanırken en düşük seviye 1 numaralı örnekte (0.041±0.002 ppm) gözlemlenmiştir. Ayrıca dokuz örneğin (9,11,12,13,19,22,23,25,29) krom geçiş seviyelerinin aynı düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Fırın et yemeklerinin demir seviyeleri 19 grupta toplanmıştır. En yüksek demir seviyesi 28 numaralı örnekte (9.230±0.167ppm) olarak saptanırken en düşük seviyenin 34 numaralı örnekte (0.647±0.420ppm) olduğu belirlenmiştir. Altı örnekte (8, 17, 19, 26, 30 ve 38) demir geçiş seviyelerinin aynı düzeyde olduğu görülmüştür. Bakır seviyeleri 22 grupta toplanmıştır. En yüksek bakır geçişi, 28 numaralı örnekte 0.792±0.032 olarak belirlenirken, en düşük seviye ise 5 numaralı örnekte 0.204±0.260 olarak tespit edilmiştir. On bir örneğin (1, 7, 20, 22, 29, 33, 34, 36, 37, 39, 40) bakır içeriğinin ise aynı düzeyde olduğu belirlenmiştir. Çinko seviyeleri 15 grupta toplanmış olup, en yüksek geçiş 41 numaralı örnekte 0.753±0.009, en düşük seviye ise bir numaralı örnekte 0.185±0.004 olarak belirlenmiştir.

Tablo 2. Fırın et yemeklerinde ağır metal düzeyleri (ppm).

Numune	Ağır Metal				
	Al	Cr	Fe	Cu	Zn
1	3.700±0.014	0.041±0.002	1.649±0.013	0.346±0.005	0.185±0.004
2	2.013±0.033	0.074±0.001	3.040±0.048	0.391±0.005	0.359±0.008
3	4.901±0.154	0.095±0.001	7.282±0.085	0.613±0.014	0.327±0.013
4	1.557±0.112	0.076±0.001	2.866±0.051	0.528±0.018	0.399±0.019
5	3.211±0.318	0.248±0.042	3.498±0.399	0.204±0.260	0.306±0.031
6	4.890±0.277	0.392±0.020	4.650±0.263	0.749±0.029	0.393±0.018
7	3.370±0.272	0.437±0.039	3.607±0.259	0.278±0.069	0.229±0.066
8	6.412±0.467	0.550±0.017	4.060±0.184	0.596±0.018	0.202±0.250
9	7.493±0.188	0.328±0.006	7.154±0.091	0.582±0.028	0.278±0.000
10	5.494±0.156	0.359±0.014	6.723±0.117	0.787±0.273	0.397±0.004
11	10.263±0.245	0.325±0.002	5.588±0.088	0.460±0.070	0.357±0.013
12	6.179±0.185	0.325±0.001	4.627±0.083	0.705±0.007	0.338±0.020
13	5.917±0.035	0.327±0.003	4.822±0.065	0.688±0.017	0.322±0.014
14	3.699±0.047	0.300±0.003	2.721±0.055	0.375±0.005	0.254±0.011
15	11.434±0.042	0.312±0.005	2.927±0.517	0.620±0.003	0.361±0.024
16	9.102±0.308	0.305±0.015	1.709±0.143	0.419±0.023	0.288±0.006
17	8.441±0.083	0.297±0.001	4.243±0.041	0.502±0.006	0.344±0.013
18	7.250±0.133	0.307±0.004	4.587±0.098	0.449±0.010	0.273±0.037
19	10.103±0.123	0.329±0.000	4.284±0.068	0.541±0.005	0.288±0.125
20	9.604±0.025	0.305±0.008	3.654±0.079	0.290±0.008	0.245±0.004
21	8.547±0.084	0.293±0.009	4.746±0.888	0.567±0.002	0.301±0.013
22	5.117±0.086	0.323±0.009	5.647±0.154	0.301±0.010	0.298±0.017
23	6.935±0.064	0.334±0.001	5.276±0.082	0.471±0.005	0.400±0.007
24	4.960±0.139	0.283±0.012	5.659±0.157	0.601±0.020	0.504±0.054
25	7.357±0.081	0.322±0.004	5.051±0.013	0.557±0.004	0.308±0.007
26	3.658±0.040	0.531±0.014	4.306±0.068	0.521±0.003	0.361±0.007
27	11.072±0.133	0.510±0.008	4.985±0.154	0.481±0.016	0.573±0.004
28	7.132±0.158	0.361±0.018	9.230±0.167	0.792±0.032	0.522±0.031
29	5.298±0.057	0.336±0.010	6.853±0.115	0.318±0.006	0.492±0.014
30	8.674±0.099	0.276±0.022	4.359±0.301	0.219±0.013	0.277±0.070
31	4.798±0.124	0.603±0.039	2.441±0.943	0.402±0.239	0.628±0.048
32	5.410±0.478	0.596±0.000	2.132±0.387	0.414±0.041	0.478±0.026
33	2.889±0.231	0.578±0.026	1.389±0.675	0.279±0.112	0.329±0.018
34	5.289±0.191	0.560±0.007	0.647±0.420	0.321±0.166	0.362±0.017
35	5.958±0.102	0.573±0.005	1.799±0.035	0.234±0.002	0.599±0.007
36	4.256±0.082	0.603±0.000	2.252±0.905	0.332±0.069	0.514±0.113
37	3.836±0.481	0.613±0.014	2.780±0.184	0.339±0.057	0.327±0.028
38	5.668±0.291	0.647±0.025	4.059±0.199	0.417±0.028	0.392±0.029
39	2.703±0.098	0.883±0.019	1.545±0.078	0.263±0.006	0.602±0.013
40	6.238±0.218	0.592±0.005	2.120±0.071	0.303±0.009	0.492±0.013
41	4.215±0.024	0.594±0.012	2.403±0.018	0.384±0.001	0.753±0.009
X̄	5.97	0.394	3.985	0.455	0.382

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada 200°C’de alüminyum folyo kaplarda pişirilen et yemeği numunesine ait migrasyon değeri (2.924± 0.107 ppm) en yüksek seviyede tespit edilmiştir. Sıcaklık faktörünün, alüminyumun gıdaya geçişi üzerinde etkili

olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Çalışmamıza benzer şekilde Bassoioni ve ark. (22), farklı bileşimlerde hazırladıkları alüminyum folyo ile kaplı et yemeği örneklerinde, artan ısı işlemi ile alüminyum migrasyonunun da arttığını tespit etmişlerdir. İnan-Eroğlu ve

ark. (23)'ın, fırın tepsisinde 150°C'de 40 dakika ve 200°C'de 20 dakika alüminyum folyo kullanılarak pişirilen balıklarda alüminyum seviyesinin tespiti üzerine yaptıkları çalışmada, sıcaklık arttıkça alüminyum sızıntısının daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Busari ve Akpambang (24), alüminyum folyoda farklı süre ve sıcaklıkta (140 °C-200 °C) pişirilen sığır ve balık etlerinde alüminyum migrasyon seviyesinin en yüksek 200°C'de pişirilenlerde olduğunu ortaya koymuştur. Razeka ve ark (25), alüminyum pişirme kaplarında pişirilen baklada alüminyum düzeyinin 22.29 mg/kg'dan 43.2 mg/kg'a yükseldiği ve diğer pişirme kapları için pişirildikten sonra alüminyum metal için geçiş olmadığını tespit etmiştir. Çalışma bulgularımızdan düşük olarak, Filippini ve ark (26), et ve et ürünlerinde alüminyum konsantrasyonunu 584.59 µg/kg (0.58459 ppm) olarak belirlemişlerdir. Asit katkısının ve baharat ilavesinin ise gıdaya alüminyum geçişini arttırdığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (22, 27).

Bu çalışmada, krom ve demirin gıdaya geçişinin en yüksek 150 ve 180°C'de olduğu, bakır için ise en yüksek geçişin 180 ve 200°C'de gerçekleştiği belirlenmiştir. Öte yandan, sıcaklık faktörünün çinko geçişi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Fırın et yemeği örneklerinde krom geçiş seviyeleri FDA ve SCF limitlerinin altında kalırken, 37 örnekte (%90,24) CAC'nun belirlediği izin verilen değeri ($>0,2$ mg/kg) aştığı tespit edilmiştir. Ancak, tüm örneklerde demir geçişinin CAC'nun belirlediği 30-150 mg/kg aralığındaki limitlerin altında olduğu belirlenmiştir (13). Purchas ve ark. (28), pişirme süresi ve sıcaklık farklılığının demir migrasyonu açısından önemli olmadığını belirtmişlerdir.

Tüm örneklerle ait bakır geçiş seviyeleri, CAC (40 mg/kg)'nın limitlerinin altında olduğu belirlenmiştir (13). Çalışmamızın bulgularıyla (0.455 ppm) benzer şekilde, Bamuwamy ve ark. (29)'da sığır etine ait fırınlanmış gıda örneklerindeki bakır düzeyini ortalama 0.37 mg/kg olarak tespit etmişlerdir.

Benzer şekilde bu çalışmada, gıda örneklerindeki çinko düzeyleri de (0.382 ppm) CAC limitinin (60 mg/kg), altında bulunmuştur. Djinoovic-Stojanovic ve ark. (30), domuz eti türevli kuru fermente sosis, tütülenmiş et ürünleri, kurutulmuş et ürünleri ve pişirilmiş sosislerde çinko seviyelerini sırasıyla 32.7 mg/kg, 16.7 mg/kg, 27.5 mg/kg ve 14.3 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Yine, Joyce ve ark. (31) gıda da tespit edilen çinko seviyelerinin çalışmamızdan yüksek (ortalama 7.40 ppm) düzeylerde olduğunu bildirmişlerdir. Çinko seviyesi, etin orijini, işlenmesi ve pişirme metotları gibi kriterlerden etkilenmektedir.

Çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde, Menezes ve ark. (32) da çinko migrasyonu ile ısıtma işlemi arasında anlamlı bir ilişki bulamamıştır. Buna karşın, Demont ve ark. (20) sıcaklık arttıkça element salınımının da arttığını belirtmiş, Rathore ve

Khangerot (33) ise ağır metallerin (kadmium, krom, kobalt, bakır, demir, kurşun, manganez, cıva, nikel ve çinko) akut toksisitesinin sıcaklık artışıyla yükseldiğini bildirmiştir. Bu durum, farklı çalışmalarda sıcaklığın metal geçişi üzerindeki etkisine dair değişik sonuçlar olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda ambalaj materyallerinin, alüminyum geçişi üzerinde etkili olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Ambalaj materyalleri arasına yapılan karşılaştırmaya göre, alüminyum geçişi en yüksek alüminyum folyo kaplarda pişirilen et yemeklerine ait olup, porselen ve cam kapların etki düzeyleri arasında bir fark yoktur.

Dordevic ve ark. (34), 11 farklı gıda ürünüde yaptıkları çalışmada, en yüksek alüminyum seviyelerini marine edilmiş *Salmo salar* (41.86 ± 0.56 mg/kg), *Scomber scombrus* (49.34 ± 0.44 mg/kg) ve ördek göğsü (117.26 ± 1.37 mg/kg) örneklerinde tespit etmiştir. Bu değerler, çalışmamızda elde edilen bulgulardan oldukça yüksek olup, alüminyum folyoda pişirmenin gıdalara alüminyum geçişine neden olduğunu göstermektedir. Gıdaların alüminyum folyoya sarılarak pişirilmesi sırasında, gıdaya alüminyum geçişinin göz ardı edilemeyecek düzeyde olması ve bu gıdaların pişirme sırasında ambalajlanmasında farklı materyallerin kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, krom geçişi en yüksek cam kaplarda pişirilen et yemeklerine ait olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, demir ve çinko geçişi ise alüminyum folyo kaplarda pişirilen et yemeklerinde belirlenmiştir. Ancak ambalaj materyalinin, bakır migrasyonuna olan etkisi istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlemlenmiştir ($p>0.05$). Kamerud ve ark. (35), paslanmaz çelik tencerede, 2-20 saatlik pişirme süreleri, 10 ardışık pişirme döngüsü ile domates sosunda nikel ve krom metallerinin paslanmaz çeliğin derecesine bağlı olarak sırasıyla 26 ve 7 kat arttığını, pişirme süresinin uzamasıyla bu katsayının sırasıyla 34 ve 35 kat arttığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda, krom geçişinin en çok cam kaplarda gözlenmesinin sebebi, krom bileşiklerinin seramik ve cam ürünlerinin imalatında kullanılmasından ötürü olabileceği düşünülmektedir. Buna ilaveten, Mania ve ark. (36)'ları da seramik ve cam kapların üretim sürecinde çinko ve bakırda kullanılan bileşikler arasında olabileceğini belirtmiştir. Ajmal ve ark. (37), Hindistan'da üretilen seramik içme kaplarından nikel ve krom salınımını inceleyerek, krom konsantrasyonlarını çayda 62-119 µg/L, portakal suyunda ise 66-945 µg/L olarak tespit etmiştir.

Yiyeceklerin hazırlanmasında ve pişirilmesinde seramik ve cam kaplar, yiyecek saklamanın yanı sıra kullanılabilir. Gerçek migrasyonu ölçmek için bu, seramik ve cam eşyaların mutfakta kullanımını yansıtan uygun koşulların seçilmesini gerektirmektedir. Bu koşullar, değişken sıcaklık ve temas süresi ve belirli bir gıda maddesiyle teması simüle edebilen uygun sıvıların

kullanılması yoluyla mümkün olup üzerine daha çok çalışılması gerekmektedir.

Kodeks Alimentarius Komisyonu, gıdalarda izin verilen demir seviyesini 30-150 mg/kg olarak belirlemiştir. Çalışmamızda incelenen tüm fırın et yemeği örneklerinde, demir geçiş seviyesi (3.985 ppm) bu limitlerin altında bulunmuştur.

WHO ve CAC gıdalarda bakır için izin verdiği sınır değer, 40 mg/kg olarak belirlenmişken, insanlar için öldürücü dozun 100 (mg/kg vücut ağırlığı) olduğunu bildirmişlerdir. CAC, Gıdalarda izin verilen maksimum Cu seviyesini 40 mg/kg olarak belirtmiştir (13). Bu tez çalışmasında, fırın et yemeklerine ait tüm örneklerde bakır geçiş seviyeleri (0.455 ppm) yukarıda belirtilen limitlerinin altında olduğu saptanmıştır.

EFSA, çinko için tolere edilebilir üst alım seviyesini 40 mg/dL olarak belirlerken (38), CAC gıdalarda izin verilen maksimum seviyeyi 60 mg/kg olarak belirtmiştir (13). Çalışmamızda analiz edilen fırın et yemeği örneklerinde belirlenen çinko seviyeleri (0.382 ppm) bu limitlerin oldukça altında bulunmuştur. Alüminyum düzeyleri (5.97 ppm) ise JECFA'nın belirlediği alınabilir seviyelerin (PTWI: 2,0 mg/kg vücut ağırlığı; 20 mg/kg günlük, 70 kg birey) altında bulunmuştur. Bu sonuçlar, fırın et yemeklerinin alüminyum açısından güvenli seviyelerde olduğunu göstermektedir

Alüminyum tepsilerde pişirilen et yemeklerindeki alüminyum geçiş seviyeleri, JECFA'nın belirlediği alınabilir limitlerin (9) altında olsa da, alüminyumun yerkabuğunda en bol bulunan elementlerden biri olduğu ve nüfusun birçok kaynaktan alüminyuma maruz kaldığı göz önünde bulundurulmalıdır. Alüminyum bileşikleri oral alımdan sonra genellikle düşük oranda emilir (maksimum yaklaşık %1). Emilen alüminyum, ilk aşamada yaklaşık 1 günlük yarılanma ömrüyle esas olarak idrar yoluyla atılır (9). Ancak uzun süreli alımlarda yarılanma ömrü 50 yıla kadar çıkabilir, bu da vücutta alüminyum birikiminin mümkün olduğunu göstermektedir (9, 39).

Sonuç olarak, laboratuvar ortamında hazırlanan alüminyum folyoda 200 °C'de pişirilen et yemeğinin; 2.924 mg/kg düzeyinde alüminyum içeriğine sahip olduğu, ortalama bir porsiyonun 250 g olduğunda hareketle, ortalama 70 kg ağırlığındaki bir kişinin 0.731 mg besin kaynaklı alüminyuma maruz kalması söz konusu olacaktır. Alüminyum için besin kaynaklı kabul üst limitin 140 mg olduğu göz önüne alınırsa, düzenli olarak tüketilmesi ile sınır değerinde üzerinde alüminyum alınması söz konusu olurken, halk sağlığı açısından bir tehdit söz konusu olacaktır. Bu bulgular, alüminyum içerikli mutfak gereçlerinin pişirme sırasında ısıya maruz kalmasının, alüminyum migrasyonuna neden olacağını açık bir biçimde ortaya koymaktadır. Bu sebepten dolayı, alüminyum içeren ambalaj malzemelerinin ısı işlem gerektirmeyen uygulamalarda kullanılmasını öneriyoruz.

Ayrıca pişirme kaplarından migrasyona sebep olan korozyonu azaltmak ve direnç kazandırmak için malzemelerin kaplama işlemleriyle geliştirilmesi, güçlendirilmesi, aile tipi işletmeler tarafından kullanılan malzeme girdilerinin düzenlenmesi ve alternatif stratejiler geliştirilerek bu malzemelerin ekonomik fizibilitesinin belirlenmesi, kültürel kabulü ve pratik erişiminin daha iyi değerlendirilmesi sağlanarak farklı pazarlarda çeşitli yaklaşımların değerlendirilmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Ungureanu EL, Mustatea G. Toxicity of heavy metals. Saleh HM, Hassan AI eds. In: Environmental Impact and Remediation of Heavy Metals. Rijeka, IntechOpen, 2022.
2. Şahin B. Çiğ Süt Örneklerinde Ağır Metal Düzeylerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum 2021.
3. Yadav M, George N, Dwibedi V. Emergence of toxic trace elements in plant environments: Insights into potential of silica nanoparticles for mitigation of metal toxicity in plants. Environmental Pollution, 2023; 122112.
4. Alasfar RH, Isaifan RJ. Aluminum environmental pollution: the silent killer. Environmental Science and Pollution Research, 2021; 28(33): 44587-44597.
5. Eroğlu Eİ, Güleç A, Ayaz A. Farklı Alüminyum Folyolarda Fırınlanan Et Türlerinin Tüketimi: Alüminyum Maruziyet Riskinin Değerlendirilmesi. Beslenme ve Diyet Dergisi, 2017; 45(2): 137-144.
6. Üçüncü M. Gıda Ambalajlama Teknolojisi. İzmir: Ambalaj Sanayicileri Derneği İktisadi İşletmesi, 2007; p. 895.
7. Martinez CS, Escobar AG, Uranga-Ocio JA, Peçanha FM, Vassallo DV, Exley C, Wiggers GA. Aluminum exposure for 60 days at human dietary levels impairs spermatogenesis and sperm quality in rats. Reproductive Toxicology, 2017; 73: 128-141.
8. FAO/WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants: thirty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, WHO technical report series, 1989.
9. FAO/WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants: Seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome, WHO technical report series, 2011.
10. Rana MN, Tangpong J, Rahman MM. Toxicodynamics of lead, cadmium, mercury and arsenic-induced kidney toxicity and treatment strategy: a mini review. Toxicology reports 2018; 5: 704-713.
11. Gümüş NE, Gökbel F, Aydın Z. Karaman İlinde Tüketilen Balıklarda Ağır Metal Birikimi ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri. Çanakkale Onsekiz Mart University Journal of Marine Sciences and Fisheries 2024; 7(2): 127-137.
12. SCF (Scientific Committee on Food). Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Trivalent Chromium. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 2003.
13. Codex Alimentarius Commission (CAC). Doc. no. CX/FAC 96/17 Codex general standard for contaminants and toxins in foods, Joint FAO/WHO food standards programme, Technical Report Series 776, 1995.
14. ATSDR, Draft Toxicological Profile for Lead. Atlanta, GA, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2020

15. ATSDR, Draft toxicological profile for cadmium. Atlanta, GA, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008.
16. King SW, Savory J, Wills MR, Gitelman HJ. The clinical biochemistry of aluminum. CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 1981; 14(1): 1-20.
17. WHO (World Health Organization). Safety evaluation of certain food additives and contaminants, WHO Food additives Series 46. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2001.
18. Verissimo MI, Oliveira JA, Gomes MTS. Leaching of aluminium from cooking pans and food containers. Sens Actuators B Chem, 2006; 118(1-2): 192-197.
19. Pennington JA, Aluminium content of foods and diets, Food Additives & Contaminants, 1988; 5(2): 161-232.
24. Busari YO, Akpambang VOE. Assessment of the levels of Aluminium in Fish and Beef Cooked in Aluminium Foil. Journal of ChemResearch Volume 2019; 1(2).
25. Abdel Razeka TM, Kishk YFM, Khalil NSA, Shehtaa AM. Migration Of Iron And Aluminum From Different Cookwares To Faba Bean After Cooking Cycles And Storage Refrigerated. Journal Of Environmental Science 2018; 42(1): 45-58.
26. Filippini T, Tancredi S, Malagoli C, Cilloni S, Malavolti M, Violi F, Vinceti M. Aluminum and tin: Food contamination and dietary intake in an Italian population. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 2019; 52: 293-301.
27. Osman NA, Zaki A, Agamy NF, Shehata GM. Aluminum in food: Dietary exposure among adolescent residents in the food catering establishments in Alexandria, Egypt. Global Journal of Pharmaceutical Education and Research 2017; 6(1-2).
28. Purchas RW, Simcock DC, Knight TW, Wilkinson BHP. Variation in the form of iron in beef and lamb meat and losses of iron during cooking and storage. International journal of food science & technology 2003; 38(7): 827-837.
29. Bamuwamy M, Ogwok P, Tumuhairwe V. Cancer and non-cancer risks associated with heavy metal exposures from street foods: evaluation of roasted meats in an urban setting. Journal of Environment Pollution and Human Health 2015; 3(2): 24-30.
30. DjinoVIC-Stojanovic JM, Nikolic DM, Vranic DV, Babic JA, Milijasevic MP, Pezo LL, Jankovic SD. Zinc and magnesium in different types of meat and meat products from the Serbian market. Journal of Food Composition and Analysis 2017; 59: 50-54.
31. Joyce K, Emikpe BO, Asare DA, Asenso TN, Yeboah R, Jarikre TA, Jagun JA. Effects of different cooking methods on heavy metals level in fresh and smoked game meat. Journal of Food Processing & Technology 2016; 7(9): 9-11.
20. Demont M, Boutakhrit K, Fekete V, Bolle F, Van Loco J. Migration of 18 trace elements from ceramic food contact material: Influence of pigment, pH, nature of acid and temperature. Food and Chemical Toxicology, 2012; 50(3-4): 734-743.
21. Ataro A, McCrindle RI, Botha BM, McCrindle CME, Ndirbewu PP. Quantification of trace elements in raw cow's milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Food chemistry 2008; 111(1): 243-248.
22. Bassioni G, Mohammed FS, Al Zubaidy E, Kobrsi I. Risk assessment of using aluminum foil in food preparation. Int. J. Electrochem. Sci, 2012; 7(5): 4498-4509.
23. Inan-Eroglu E, Gulec A, Ayaz A. Effects of different pH, temperature and foils on aluminum leaching from baked fish by ICP-MS. Czech Journal of Food Sciences 2019; 37(3): 165-172.
32. Menezes EA, Oliveira AF, França CJ, Souza GB, Nogueira ARA. Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, and crude protein in beef, pork and chicken after thermal processing. Food Chemistry 2018; 240: 75-83.
33. Rathore RS, Khangarot BS. Effects of temperature on the sensitivity of sludge worm Tubifex tubifex Müller to selected heavy metals. Ecotoxicology and environmental safety 2002; 53(1): 27-36.
34. Dordevic D, Buchtova H, Jancikova S, Macharackova B, Jarosova M, Vitez T, Kushkevych I. Aluminum contamination of food during culinary preparation: Case study with aluminum foil and consumers' preferences. Food science & nutrition 2019; 7(10): 3349-3360.
35. Kamerud KL, Hobbie KA, Anderson KA. Stainless steel leaches nickel and chromium into foods during cooking. Journal of agricultural and food chemistry 2013; 61(39): 9495-9501.
36. Mania M, Szynal T, Rebeniak M, Postupolski J. Exposure assessment to lead, cadmium, zinc and copper released from ceramic and glass wares intended to come into contact with food. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny 2018; 69(4).
37. Ajmal M, Khan A, Nomani AA, Ahmed S. Heavy metals: leaching from glazed surfaces of tea mugs. Sci. Total Environ 1997; 207: 49-54.
38. EFSA. Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. European Food Safety Authority. EFSA J, 2006; 10, 1-45.
39. EFSA. Safety of aluminium from dietary intake. Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and food contact materials. 2008. In: EFSA J 754:1-4.
<http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/754.pdf>. Accessed 23 Jan 2018).



Polifarmaziye Maruz Kalan Buzağlarda İntestinal Mukozal Hasarlanma Mevcut Mu? Polifarmaziye Maruz Buzağlarda İntestinal Hasar

Deniz ALIÇ URAL¹ ✉

¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sultanhisar Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Aydın/Türkiye

◆ Geliş Tarihi/Received: 25.02.2025

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 19.03.2025

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2025

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Aliç Ural D. Polifarmaziye Maruz Kalan Buzağlarda İntestinal Mukozal Hasarlanma Mevcut Mu?

Polifarmaziye Maruz Buzağlarda İntestinal Hasar. Bozok Vet Sci (2025) 6, (1):22-25.

Özet: Bu saha araştırması retrospektif olarak planlanarak, Aydın'da il ya da ilçe sınırlarında farklı işletmelere ait 59 buzağda gerçekleştirildi. Araştırma kapsamında yer alan her buzağı, ishal (Grup I; n=20) ve/veya pnömoni (Grup II; n=20) nedeniyle birden fazla ilaç ile sağaltıma tabi tutulmuş olanlar arasından seçildi. Başlangıç kriteri olarak en az bir haftadır çoklu ilaç uygulamasında bulunulanlar dahil edildi. Karşılaştırmalı olarak sağlıklı 19 diğer buzağı da kontrol grubu (III) olarak çalışmada yer buldu. Her buzağda uzman veteriner hekim tarafından elde edilen kan örneklerinden santrifüj sonrası serum çıkartılarak dondurucuda muhafaza edildi. Ticari Bovine Diamin Oksidaz (DAO) ELISA testleri aracılığıyla rekabetçi enzim immünoassay tekniği vasıtasıyla serum DAO değerleri saptandı. Sırası ile Grup I, II ve III'te ortalama±standart hata DAO (ng/mL) değerleri $8,22 \pm 2,02$, $11,44 \pm 1,96$ ve $28,90 \pm 3,59$ ($p < 0.001$) olarak tespit edildi. Sonuç olarak polifarmaziye en az 1 hafta maruz kalan ishaller ve/veya pnömonili buzağlarda intestinal mukozal hasarlanma gelişebileceği, bunun da sağlıklı kontrollere göre azalan DAO seviyeleri ile tespit edilebileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Buzağı, Diamin Oksidaz, İntestinal Mukozal Hasar, Polifarmazi

Is There Intestinal Mucosal Damage in Calves Exposed to Polypharmacy? Intestinal Damage in Calves Exposed to Polypharmacy

Abstract: This field study was planned retrospectively and was carried out on 59 calves belonging to different farms within the provincial or district borders of Aydın. Each calf included in the study was selected among those who had been subjected to treatment with more than one drug due to diarrhea (Group I; n=20) and/or pneumonia (Group II; n=20). As an initial criterion, those which had been treated with multiple drugs for at least one week were included. Nineteen other healthy calves were included in the study as the control group (III) for comparison. After centrifugation, serum was extracted from the blood samples obtained from each calf by specialist veterinarians and stored in the freezer. After centrifugation, serum was extracted from the blood samples obtained from each calf by a specialist veterinarian and stored in the freezer. Serum DAO values were determined by means of competitive enzyme immunoassay technique via commercial Bovine Diamine Oxidase (DAO) ELISA tests. The mean±standard error DAO (ng/mL) values were determined as 8.22 ± 2.02 , 11.44 ± 1.96 and 28.90 ± 3.59 ($p < 0.001$) in Groups I, II and III, respectively. As a result, it could be suggested that intestinal mucosal damage may develop in calves with diarrhea and/or pneumonia exposed to polypharmacy for at least 1 week, and this can be detected by decreased DAO levels compared to healthy controls.

Keywords: Calf, Diamine Oxidase, Intestinal Mucosal Damage, Polypharmacy

1. Giriş

Polifarmazi herhangi bir canlıda (bireyde ya da hayvanda) uygun olmayan, tekrarlayan kullanımla çoklu ilaca maruz kalmayı tanımlayabilir. İnsanlarda kullanılan tanımlamadan farklı olarak (tek bir hastada tekrarlayan kullanımda 6'dan fazla ilaç verilmesi), isteğe bağlı rakam verilmesi (" $>n$ ") hayvan modellemelerinde uygun görülmemektedir (1). Bunun yerine bir başka makalede (2) tanımlama değiştirilerek; bir canlıda tıbbi ihtiyacın ötesinde birden çok ilacın tekrarlayan kullanımı olarak belirtilmiştir ki bu durum hayvan refahını da bozmaktadır. Genel prensip olarak kullanılan her fazla ilaç, yan etki riskini arttırdığı gibi ilaç-ilac etkileşimi açısından da olumsuzluklara sebebiyet verebilmektedir.

Diamin oksidaz (DAO), enterositleri histamine karşı korumak için ince bağırsağın mukozasında üretilen baskın bir anti-histamin hücre içi enzimdir (3). DAO, bağırsak mekanik bariyerinin bütünlüğünü ve mukozal villus hasarının derecesini değerlendirmek için kullanılan ana indekstir (4). DAO, özellikle yüksek aktiviteye sahip olgun villöz hücrelerin apikal ucunda bulunur ve aktivitesi, ince bağırsak mukozasının bütünlüğünü ve olgunluğunu yansıtır (5). Mukozal hasar veya bağırsak duvarının gelişmemiş bütünlüğü durumunda, DAO jejunal villus uçlarından sistemik dolaşıma sızar (6). Kandaki DAO enzimi seviyeleri bağırsak geçirgenliğinin biyolojik belirteci olarak kullanılabilir (7). İlâveten ince bağırsak mukozal hasarı, DAO aktivitesini azaltabilir (7). Yükselen DAO serum

seviyeleri ve azalan DAO aktivitesi, artan bağırsak geçirgenliği ve dolayısıyla daha düşük bağırsak gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (7,8). Bu çalışmada Aydın sınırları içerisinde yer alan farklı işletmelerden 59 buzağıda ishale ve/veya pnömoniye ilişkin olarak en az 1 hafta polifarmaziye maruz kalan buzağılarda intestinal mukozal hasarlanmanın tespiti amaçlandı.

2. Materyal ve Metot

2.1. Coğrafik Lokasyon ve Demografik Kısmi Veriler

Merkez il Aydın ve civar ilçelerde gerçekleştirilen bu saha çalışması retrospektif olarak planlanmış, toplamda 59 buzağı kapsama alınmıştır. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu [HADYEK] belgesi 27/10/2021 tarihli, no: 64583101/2021/146 dahilinde her buzağı sahibinden de ayrı ayrı yazılı onam formları alınarak buzağılar çalışmaya dahil edilmişlerdir.

2.2. Gruplara Tasnifleme

Çalışma kapsamına alınan her buzağı, yukarıda da sözü edildiği üzere merkez dahilinde farklı bölgelerden dahil edildi. İshalli buzağılar (Grup I; n=20 ve/veya pnömonili olanlar Grup II; n=20) hasta grupları teşekkül ederken sağlıklı 19 diğer buzağı da kontrol grubu (III) olarak çalışmada yer buldu.

2.3. Dahil Edilme Kriterleri

Buzağılar ishal ve/veya pnömoni nedeniyle birden fazla ilaç ile sağaltım denemesine tabi tutulmuş olanlar arasından seçildi. Başlangıç kriteri olarak en az bir haftadır çoklu ilaç (ishal için oksitetrasiklin, neomisin, enrofloksasin, streptomisin, sülfamezatin; pnömoni için enrofloksasin, oksitetrasiklin, streptomisin, trimetoprim) uygulamasında bulunulanlar dahil edildi. Karşılaştırmalı olarak herhangi bir ilaç uygulanmamış sağlıklı olanlar kontrol grubu olarak tutuldu. Dahil edilen tüm buzağılar Holstein ırkı idi.

2.4. Laboratuvar Akış Şemasına Ait Kesit

Dahil edilen buzağıların tamamında yukarıda sözü edilen 1'er ml kan örneğini *V. jugularis* aracılığıyla temin ederek hızlıca laboratuvar işlemlerine alınmak üzere soğuk zincirde sevk edildi. Laboratuvarda santrifüj sonrası serum örnekleri, analiz gerçekleştirilene kadar Eppendorf tüplerine ayrılarak -80 °C dondurucuda saklandı. Daha sonra, Bovine Diamin Oksidaz ELISA testi ile örneklerin analizi yapıldı. DAO ELISA kiti (My Biosource), rekabetçi enzim immünoassay tekniğini temel alan bir testtir. Bu yöntemde, poliklonal anti-DAO antikor ve DAO-HRP konjugatı kullanıldı. Ölçüm aralığı 0,312 ng/ml ile 20 ng/ml arasındaydı. Serum numuneleri ve tampon, önceden kaplanmış plakalara eklenerek DAO-HRP konjugatı ile bir saat boyunca inkübe edildi. Kuluçka süresinin ardından, kuyucuklar boşaltıldı ve beş kez yıkandı. Sonrasında kuyucuklar, HRP enzimi için bir substrat ile

inkübe edildi. Enzim-substrat reaksiyonu, mavi renkli bir kompleksin oluşmasına yol açmaktadır. Reaksiyonu durdurmak için bir durdurma solüsyonu eklendi, bu da mavi renkli enzim-substrat kompleksini sarıya dönüştürmektedir. Rengin yoğunluğu, spektrofotometrik olarak 450 nm'de bir mikropilaka okuyucuda ölçüldü. Sandwich ELISA metodolojisine ilişkin herhangi bir analitik hata şekillenmedi. Buzağı serumları hatasızca incelenebildi. Analizler RDA Grup, Tekstilkentte İstanbul'da gerçekleştirilebildi. Ortalama DAO (ng/mL) değerleri karşılaştırmalı şekilde tablo 1'de sunuldu.

Tablo 1. Polifarmaziye maruz kalan buzağılarda DAO düzeyleri

	Grup I	Grup II	Grup III
	Polifarmazi	Polifarmazi	Kontrol
	(İshalli	(Pnömonili	(Sağlıklı
	buzağılar)	buzağılar)	buzağılar)
DAO	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$
(ng/mL)	8,22 ± 2,02 ^a	11,44 ± 1,96	28,90 ± 3,59 ^b

^{a,b}: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır.

2.5. İstatistiksel Analizler

Tanımlayıcı istatistikler elde edilen tüm verilere uygulandı. Veri akışında ortalama ve standart hata belirlendi. Her 3 grupta serum DAO seviyelerine ait değişim analizinde Kruskal Wallis ANOVA testi ile sıralamaya dayalı nonparametrik metodoloji tercih edildi. İstatistiksel analizler Graphpad Prism Software (v. 9.2, Amerika) ile gerçekleştirildi. P değeri =0.05 olarak kullanıldı.

3. Bulgular

3.1. Demografik Veriler

Dahil edilen buzağılarda gruplara dağılım açısından; grup I'de 19-38 günlük yaşta 11 dişi, 9 erkek, grup II'de 13-30 günlük yaşta 14 dişi, 6 erkek buzağı yer alırken, sağlıklı kontrollerin yer aldığı grup III'te 15-44 günlük yaşlarda 6 dişi, 3 erkek buzağı yer aldı.

Elde edilen verilere ait analizlerle sonuçlar tablo 1'de sunuldu. Polifarmaziye maruz kalan buzağılarda DAO düzeylerinin ortalama (ng/mL) ve standart sapma değerleri; ishalli buzağılarda 8,22±2,02 ve pnömonili buzağılarda 11,44±1,96 olarak belirlenirken sağlıklı buzağılarda 28,90±3,59 olarak saptandı.

4. Tartışma

Yürütülen bir başka çalışmada antibiyotik tedavisine maruz kalan ve gastroenterolojik ya da solunum sistemi problemi mevcut 20 hasta buzağıda, karşılaştırmalı olarak 10 diğer

sağlıklı buzağıya kıyasla serum DAO aktivitesi ölçülmüştür. İlgili çalışmada ng/mL cinsinden DAO seviyeleri ortalama 5,552 olarak belirlenirken, sağlıklı kontrollerde 16,48 olarak görülmüştür (9). Bu çalışmada sadece antibakteriyel uygulamalar değil, polifarmaziye maruz kalan buzağılar araştırılmıştır.

DAO, bir enzim olarak diaminlerden histamin, putresin ve kadaverin'in oksidasyonunu katalize etmektedir (10). İnsan ve rodentlerde, DAO spesifik olarak olgunlaşmış villöz hücrelerin apikal uç kısımlarında yerleşerek, yüksek aktivite göstermektedir. Son sözü edilen aktivite ince bağırsakta, bütünlük ve olgunlaşmayı yansıtmaktadır. İnsanlar ve hayvanlarda gerçekleştirilen pek çok çalışma ile DAO aktivitesinin ince bağırsakta permeabilite artışı ile ters korelasyon içerisinde olduğunu göstermektedir (11,12). Bu çalışma buzağılarda intestinal mukozal hasarlanmanın tespitinde mihenk taşı olabilecek niteliğe haizdir.

İshalli buzağının dışkı kıvamı ve kan pH'sına dayalı olarak sınıflandırıldığı bir çalışmada (13), şiddetli veya orta derecede ishallerli buzağılarda kontrol grubuna göre; şiddetli grupta da orta dereceli gruba göre plazma DAO aktivitesinin anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir. Quanz (14), disbiyoz belirteçleriyle çakışan klinik belirtilerin çalışma grubundaki ineklerde gastrointestinal distrese işaret ettiği haftalarda plazma DAO aktivitesinin açıkça azaldığını bildirmektedir. Erken patojenik *Escherichia coli* (*E.coli*) enfeksiyonunun yeni doğan buzağının bağırsak bariyeri ve bağışıklık fonksiyonu üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada (15); artan DAO ve IL-6 seviyeleri gösterilmektedir. Önceki bir çalışmada Aydın İlinde yer alan 71 buzağıdan 3 farklı çiftlikte yapılan incelemeye göre gerek enfeksiyöz gerekse non-enfeksiyöz ishallerli buzağılarla karşılaştırmalı olarak sağlıklı kontrol buzağılarda DAO (ng/mL) ölçümleri sırası ile ortalama±standart hata bağlamında $6,52 \pm 2,85$, $7,16 \pm 3,40$ ve $17,05 \pm 2,63$ ($p < 0,001$) olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler ilgili enzimin tanısallık manada yarar sağlayabileceğini ve muhtemel intestinal mukozal hasarlanmanın ishallerle paralel olarak geliştiğini gösterebilir (16).

Önceki bir çalışmada 22 ishallerli Japon Siyah Buzağısı eşit gruplara bölünerek probiyotik yada antibiyotiğe maruz bırakılmıştır. Sekiz günlük sağaltım dahilinde serum DAO aktivitesi sadece probiyotik alan buzağılarda belirgin şekilde artmış (1. günde $64,4 \pm 7,2$ 'ye karşın 8. günde $76,3 \pm 5,1$ IU/ml), elde edilen sonuçları probiyotiklerin serum DAO aktivitesi üzerine ishallerli buzağılarda etkin olduğuna işaret etmiştir (13). Yurdumuzda gerçekleştirilen mühim bir çalışmada ishallerli buzağılara rektal yolla çoklu suş probiyotik sağaltımı uygulanmış; ortalama DAO seviyeleri (ng/mL) açısından sırası ile önce ve sonra değerleri $8,48 \pm 1,67$ 'e karşın $28,06 \pm 3,51$, olarak istatistiksel öneme haiz ($p < 0,001$) değişimlerle saptanmıştır. İlgili çalışma sonuçlarına göre ishallerle bağlantılı olarak intestinal mukozal hasarlanma

gelişebileceği, ardışık olarak plazma DAO aktivitesinin artacağı öne sürülmüştür. Bununla beraber 10 günlük rektal enema probiyotik sağaltımının bu durumu tersine çevirdiği; orantılı geri bildirim regülasyonu ile mukozal iyileşmenin sağlandığı düşünülmüştür (17).

5. Sonuç

Mikrobiyota-bağırsak-beyin eksenine dair buzağılarda herhangi bir çalışmaya rastlanılmamış olması burada yazılan ilgili çalışmayı daha da etkin kılabilir. Şöyle ki sıklıkla kullanılan bazı antibiyotikler (sefuroksim, sefotiam, izoniazid, pentamidin, klavulanik asit, klorokin], mukolitikler (asetilsistein, ambroksol vb.), bronkolitikler (aminodfilin), H2 reseptör antagonistleri (simetidin vb.) DAO ile etkileşime girmektedir (18). Bu ilaçların önemli bir kısmının buzağılarda tüm dünyada aktif olarak kullanılması DAO ile etkileşimin canlı tür düzeyinde iyice irdelenmesi ve gerekli sonuçların çıkarılarak ilgili sağaltım protokollerinin düzenlenmesi anlamına gelebilir. Nitekim bu çalışmada polifarmazi uygulanan buzağılarda azalan DAO seviyeleri buna işaret etmektedir. Polifarmazi intestinal mukozal hasara ilişkin olabileceğinden, ilaç yan etkilerine maruziyetin azaltılması açısından bu çalışmanın sonuçları dikkatle irdelenmelidir.

Kaynaklar

1. Payne RA. The epidemiology of polypharmacy. Clinical Medicine 2016; 16: 465–469. doi: 10.7861/clinmedicine.16-5-465.
2. Hunter RP, Isaza R. Polypharmacy in zoological medicine. Pharmaceutics 2017; 9(1): 10. doi: 10.3390/pharmaceutics9010010.
3. Kovacova-Hanusova E, Buday T, Gavliakova S, Plevkova J. Histamine, histamine intoxication and intolerance. Allergologia et Immunopathologia 2015; 43(5): 498–506. doi: 10.1016/j.aller.2015.05.001.
4. Fukudome I, Kobayashi M, Dabanaka K, Maeda H, Okamoto K et al. Diamine oxidase as a marker of intestinal mucosal injury and the effect of soluble dietary fiber on gastrointestinal tract toxicity after intravenous 5-fluorouracil treatment in rats. Medical Molecular Morphology 2014; 47: 100–107. doi: 10.1007/s00795-013-0060-0.
5. Honzawa Y, Nakase H, Matsuura M, Chiba T. Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease: importance of evaluation of small intestinal permeability. Inflammatory Bowel Diseases 2011; 17(2): E23–E25. doi: 10.1002/ibd.21401.
6. Zhang L, Zhang L, Zhan XA, Zeng X, Zhou L et al. Effects of dietary supplementation of probiotic, Clostridium butyricum, on growth performance, immune response, intestinal barrier function, and digestive enzyme activity in broiler chickens challenged with Escherichia coli K88. Journal of Animal Science and Biotechnology 2016; 7(1): 3. doi: 10.1186/s40104-015-0038-9.
7. Alizadeh A, Akbari P, Garssen J, Fink-Gremmels J, Braber S. Epithelial integrity, junctional complexes, and biomarkers associated with intestinal functions. Tissue Barriers 2022; 10(3): 1996830. doi: 10.1080/21688370.2021.1996830.

8. Song Z, Cheng K, Zhang L, Wang T. Dietary supplementation of enzymatically treated *Artemisia annua* could alleviate the intestinal inflammatory response in heat-stressed broilers. *Journal of Thermal Biology* 2017; 69: 184–190. doi: 10.1016/j.jtherbio.2017.07.003.
9. Aliç Ural D. Investigation of diamine oxidase as a biomarker of intestinal mucosal injury in calves exposed to antibacterial treatment. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques* 2024; 9(3): 190–196.
10. Shakir KM, Margolis S, Baylin SB. Localization of histaminase (diamine oxidase) in rat small intestinal mucosa: site of release by heparin. *Biochemical Pharmacology* 1977; 26: 2343–2347.
11. Ayuso P, Garcia-Martin E, Martinez C, Agundez JA. Genetic variability of human diamine oxidase: occurrence of three nonsynonymous polymorphisms and study of their effect on serum enzyme activity. *Pharmacogenetics and Genomics* 2007; 17: 687–693.
12. Palacios NL, Agundez JA, Diaz-Rubio M, Ayuso P. Analysis of a non-synonymous single nucleotide polymorphism of the human diamine oxidase gene (ref. SNP ID: rs1049793) in patients with Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2009; 44(9): 1041–1045. doi: 10.1080/00365520903075897.
13. Fukuda T, Tsukano K, Nakatsuji H, Suzuki K. Plasma diamine oxidase activity decline with diarrhea severity in calves indicating systemic dysfunction related to intestinal mucosal damage. *Research in Veterinary Science* 2019; 126: 127–130. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.08.004.
14. Quanz S. Dietary interventions to modulate gut function in ruminants. Doctoral dissertation, 2022.
15. He L, Wang C, Simujide H, Aricha H, Zhang J et al. Effect of early pathogenic *Escherichia coli* infection on the intestinal barrier and immune function in newborn calves. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2022; 12: 818276. doi: 10.3389/fcimb.2022.818276.
16. Aliç Ural D. Intestinal mucosal damage and intestinal permeability in non-infectious and infectious diarrheic calves in relation to diamine oxidase activity. *International Journal of Veterinary and Animal Research* 2024; 7(3): 83–86.
17. Aliç Ural D, Erdoğan S, Kılıç N, Erdoğan H, Turk E et al. Probiotic enema protects intestinal mucosae and decreases plasma diamine oxidase activity among calves with diarrhea. *Veterinaria* 2023; 72(3): 283–289.
18. Maintz L, Novak N. Histamine and histamine intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition* 2007; 85(5): 1185–1196. doi: 10.1093/ajcn/85.5.1185.



Rotavirus ile Mono- ya da Ko-Enfekte Buzağılarda Bağırsak Geçirgenliğinin Bir Adım Öncesinde Serum Zonulin Seviyeleri ile Dışkı Skorlarının Yansımaları Rotavirus ile Enfekte Buzağılarda Bağırsak Geçirgenliği

Deniz ALIÇ URAL¹ ✉

¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sultanhisar Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Aydın/Türkiye

◆ **Geliş Tarihi/Received:** 18.02.2025

◆ **Kabul Tarihi/Accepted:** 21.03.2025

◆ **Yayın Tarihi/Published:** 30.06.2025

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Aliç Ural D. Rotavirus ile Mono- ya da Ko-Enfekte Buzağılarda Bağırsak Geçirgenliğinin Bir Adım Öncesinde Serum Zonulin Seviyeleri ile Dışkı Skorlarının Yansımaları Rotavirus ile Enfekte Buzağılarda Bağırsak Geçirgenliği. Bozok Vet Sci (2025) 6, (1):16-21.

Özet: Rotavirüs kaynaklı ishallerde artmış olan intestinal permeabilite olası patogenezis mekanizmalarından birisi olarak gösterilmektedir. Bununla birlikte insan ve fare modellerinde, rotavirüslerin oluşturduğu ishalin seyri esnasında intestinal permeabiliteyi etkilemediği ya da azalttığı bildirilmektedir. Bu çalışmada özel bir Holstein buzağı işletmesinde rotavirüs ile mono-enfekte 10 ishali (3 erkek, 7 dişi; 1-17 günlük), rotavirüs ile diğer etmenlerle [n=2 buzağıda giardiasis ve cryptosporidiosis, n=3 buzağıda giardiasis ve n=3 buzağıda *Escherichia coli* K99] ko-enfekte 8 buzağı (2-24 günlük, 4 dişi, 4 erkek) ve diğer 7 sağlıklı (1-18 günlük; 5 dişi, 2 erkek) olmak üzere toplamda 25 buzağıda bağırsak geçirgenliğinin zonulin seviyelerinin tespiti ile araştırılması amaçlandı. Dışkı kıvamı 3'lü puantaj sistemi dahilinde değerlendirildiğinde mono-enfekte grupta 1-3 arası, ko-enfekte grupta 2 ile 3 bandında değişim tespit edildi. Gizli temizlik skorları açısından yapılan değerlendirmede mono-enfekte grupta 1 ile 2, ko-enfekte grupta 2 ile 3 arasında skorlar değişmekte idi. Ortalama $\pm$ standart hata serum zonulin seviyeleri (ng/mL) rotavirüs ile mono-enfekte buzağılarda 41.59 ± 6.41 , ko-enfekte buzağılarda 61.61 ± 12.42 olarak belirlenirken, kontrol grubuna (19.25 ± 6.41) göre anlamlı artışlar ($p=0.000$) görüldü. Sonuç olarak rotavirüs ile gerek mono-enfekte gerekse ko-enfekte buzağılarda zonulin seviyelerindeki artış, muhtemel intestinal permeabilite artışına işaret edebilir. Elde edilen bulgular gerek geçirgen bağırsak sendromunun teşhisine yönelik, gerekse sağaltım protokollerinde değişime neden olabilir.

Anahtar Kelimeler: Buzağı, İntestinal Permeabilite, İshal, Rotavirüs, Zonulin

Detection of Serum Zonulin Levels in Association with Intestinal Permeability in Calves Mono- or Co-Infected with Rotavirus

Abstract: Increased intestinal permeability in rotavirus-induced diarrhea is shown as one of the possible mechanisms. However, it is also claimed by the opposing view that rotaviruses do not affect or reduce intestinal permeability during the course of diarrhea in human and mouse models. In this study, it was aimed to investigate intestinal permeability in a total of 25 calves, 10 with diarrhea (3 males, 7 females; 1-17 days old) mono-infected with rotavirus, 8 calves (2-24 days old, 4 females, 4 males) co-infected with rotavirus and other agents [n=2 calves with giardiasis and cryptosporidiosis, n=3 calves with giardiasis and n=3 calves with *Escherichia coli* K99] and 7 other healthy (1-18 days old; 5 females, 2 males) in a private calf farm. When stool consistency was evaluated within the 3-point scoring system, changes were detected between 1-3 in the mono-infected group and between 2 and 3 in the co-infected group. In the evaluation made in terms of latent cleanliness scores, the scores varied between 1 and 2 in the mono-infected group and between 2 and 3 in the co-infected group. Meant standard error serum zonulin levels (ng/mL) were 41.59 ± 6.41 in rotavirus mono-infected calves and 61.61 ± 12.42 among co-infected calves whereas showed statistically significant ($p=0.000$) increases in contrast to control group 19.25 ± 6.41). As a result, increased zonulin levels detected among both mono-infected and co-infected calves with rotavirus, might denote probably elevated intestinal permeability. Obtained results would thus change diagnosis of leaky gut syndrome and treatment protocols.

Keywords: Calf, Diarrhea, Intestinal Permeability, Rotavirus, Zonulin

1. Giriş

Rotavirüs enfeksiyonları, 5 yaş altı çocuklarda şiddetli, dehidrasyona yol açan gastroenteritin önde gelen nedenidir. Rotavirüs öncelikli olarak bağırsak enterositlerini enfekte etse de, ishalden sorumlu olan altta yatan mekanizmalar henüz çözülememiştir. Rotavirüs patogenezisinde yapısal olmayan protein 4 (NSP4) enterotoksin aktivitesi ve enterik sinir sistemi (ENS) aktivasyonu (1-3) dahil olmak üzere birden fazla mekanizma önerilmiştir. Bağırsak

geçirgenliğindeki değişiklikler ve dolayısıyla ishal mekanizması olarak ortaya çıkan potansiyel elektrolit ve su sızıntısı da in vivo olarak önerilmiş ve araştırılmıştır. Bu tür çalışmalar, rotavirüsün insanlarda (4-6) veya farelerde (7) ishal sırasında bağırsak geçirgenliğini değiştirmediğini gösterse de; bu, insanlarda yaygın enterik bakteriyel enfeksiyonlar sırasında gözlemlenen artan geçirgenlikle çelişmektedir (8,9).

Buzağı ishali yaygın olarak bildirilen bir hastalıktır ve sığır üreticileri için önemli bir ekonomik kayıp nedenidir. ABD süt sığırcılığı için 2007 Ulusal Hayvan Sağlığı İzleme Sistemi (NAHMS) (10), süttten kesilen buzağı ölümlerinin %57'sinin ishalden kaynaklandığını ve vakaların çoğunun 1 ayliktan küçük buzağılarda meydana geldiğini bildirmiştir. Sadece cryptosporidiosisli buzağılarda hayvan başına 40 Euro (11), yine buzağı ishali ve/veya ishale birlikte pnömonik olanlarda 242.000 dolara kadar çıkabilen ekonomik kayıplardan bahis edilmektedir (12).

Buzağı ishalinin hem enfeksiyöz (rotavirüs, koronavirüs, *E. coli* enfeksiyonu, cryptosporidiosis, giardiasis) hem de enfeksiyöz olmayan (kolostrum vb. faktörlerle, bakım ve beslenme hataları vb.) faktörlere atfedildiği düşünülmektedir (13,14). Bu hastalığın gelişiminde birden fazla enterik patojen rol oynar. Bazı durumlarda tek bir birincil patojen neden olabilse de, ishali buzağılarda sıklıkla eş enfeksiyon görülür. Her bir patojenin yaygınlığı ve hastalık insidansı çiftliklerin coğrafi konumuna, çiftlik yönetim uygulamalarına ve sürü büyüklüğüne göre değişebilir (13,14).

Sığır rotavirüsü, buzağı ishalinin birincil etiyolojik etkenidir. Virüs, *Reoviridae* familyasındaki *Rotavirus* cinsine aittir. Rotavirüs, 11 çift sarmallı RNA segmentine (16~21 kb) sahip zarfsız bir viryondur ve ısıya dayanıksızlığı ile geniş bir pH aralığında oldukça kararludur (15). Ara kapsid proteininin (VP6) antijenik ve genetik benzerliklerine göre yedi rotavirüs serogrubu (A'dan G'ye) vardır. A grubu rotavirüsler, evcil hayvanlarda rotaviral enfeksiyonun başlıca nedenidir (16). Çoğu Bovine Rotavirüs (%95) A grubuna aittir, ancak B ve C grubu rotavirüsler de saha vakalarında tanımlanmıştır (17,18).

Rotavirüs enfeksiyonu genellikle 1 ila 2 haftalık yaştaki buzağılarda ishale neden olur. Buzağıların tükettiği süt, rotavirüsün geniş bir gastrointestinal pH seviyesi aralığında ve bağırsak epitel hücrelerinin enfeksiyonunda hayatta kalması için iyi bir ortam sağlayabilir (19). Bu durum, süttten kesilen buzağıların buzağı ishali nedeniyle olma olasılığının daha yüksek olmasını açıklayabilir. Virüsün kuluçka süresi çok kısadır (12~24 saat) (16) ve etkilenen buzağılarda oldukça akut ishale neden olur. Enfekte olduktan sonra buzağılar dışkı yoluyla 5~7 gün boyunca büyük miktarda virüs yayar, böylece çevreyi kirletir ve virüsün işletmedeki diğer buzağılara bulaşmasına olanak tanır. Virüs, küçük bağırsak villuslarının epitel hücrelerinin sitoplazmasında çoğalır. Villuslardaki olgun enterositlerin yıkımı, hasarlı hücrelerden vazoaaktif bileşenler tarafından enterik sinir sisteminin aktivasyonu ve viral bir enterotoksin (örn. NSP4) salgılanması, rotavirüs enfeksiyonuyla teşvik edilen maldigestif/malabsorptif ishalden sorumludur. Viral enfeksiyon villus atrofisine neden olur ve genellikle ince bağırsağın kuyruk kısmını etkiler. İnsan ve hayvan rotavirüsleri (örneğin domuz, sığır, kedi ve köpek) arasındaki genetik yeniden düzenleme ile birlikte türler arası aktarıma

dair kanıtlar, zoonotik rotavirüsler hakkında endişelere yol açmıştır (20). Yukarıda sözü edilen literatür bilgileri ışığında bu araştırmanın çıkış noktası saha koşullarında rotavirüs ile mono- ya da ko-enfekte buzağılarda bağırsak geçirgenliğinin mevcut olup olmadığının belirlenmesidir. Bu amaçla alandaki soru serum zonulin seviyelerinin bu amaca yönelik literatür eksikliğini karşılayıp, karşılamayacağı olabilir. Nitekim çalışmanın amacı ile doğru orantılı olarak sağlıklı kontrol grubu buzağılara kıyasla rotavirüs enfeksiyonlarının serum zonulin seviyelerindeki değişime neden olabileceği hipotezi üzerinde durulmuştur.

2. Materyal ve Metot

Mevcut bu çalışma Aydın İli, Nazilli İlçesinde mevcut özel bir Holştayn buzağı işletmesinde rotavirüs ile mono-enfekte 10 ishali (Grup I: 3 erkek, 7 dişi; 1-17 günlük, 37-55 kg), rotavirüs ile diğer etmenlerle [n=2 buzağıda giardiasis ve cryptosporidiosis, n=3 buzağıda giardiasis ve n=3 buzağıda *Escherichia coli* K99] ko-enfekte 8 buzağı (Grup II: 2-24 günlük, 4 dişi, 4 erkek, 36-58 kg) (şekil 1) ve diğer 7 sağlıklı (Grup III: 1-18 günlük; 5 dişi, 2 erkek, 43-61 kg) olmak üzere toplamda 25 buzağıda uygulandı. İshalin tespitine yönelik olarak kullanılan Vet Diagnostics (Çin) hızlı test kitleri (Şekil 1) ile gerçekleştirilen ön analizlerde herhangi başka bir bulaşıcı hastalık tespit edilemedi. Klinik muayene veteriner hekim kontrolünde dikkatle gerçekleştirilirken; solunum ile nabız frekansları tespit edilerek kayıt altına alındı. İshalin varlığının tespitine yönelik olarak dışkı kıvamı skorlandı. Tüm buzağıların bireysel kulübelerinde barındırıldıkları tespit edildi. Bu araştırma, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi (HADYEK) Yerel Etik Kurulu'nun 64583101/2021/146 rapor numarası ile yürütülmüştür.

2.1. Serum Zonulin Tayini

Yazarın önceki tecrübeleri ve elde ettiği birikimleri değerlendirdiği çalışmalara ait metodolojik yaklaşımlarına benzer şekilde (21-27) Sandwich ELISA yöntemi ile (RDA Grup İstanbul), serum zonulin tayini yapıldı. Ticari test kitleri (My Biosource Bovine Zonulin Test Kitleri, A.B.D.) aracılığıyla önceden santrifüje edilmiş olan ve ayıklanmış serum örnekleri benzer metodoloji (21-27) ile işlendi.

2.2. Dışkı Kıvamının Belirlenmesi

Dışkı kıvamının belirlenmesi rotavirüsa ilişkin ishalin var olup, olmadığının tespitine yönelik olarak çalışmada yer aldı. Dışkı kıvamı 3'lü puanaj sisteminde [0-3 arası] [dışkı skoru 0 = normal kıvam, 1 = yarı şekillenmiş veya pasta benzeri, 2 = gevşek ve 3 = sulu dışkı] yorumlandı. Dışkı skoru ≥ 2 -3 olan buzağılar diyareik olarak değerlendirildi (28).

2.3. Gizli Temizlik Skorlaması

Skorlamalarda 0 [baldır ve vücut bütünüyle temiz, üzerlerinde alt bacaklarda her hangi bir dışkı ya yok ya da çok az], 1 [Buzağının kuyruk başı ve arka son bölümü dışkı ile

bulaşık/kirli], 2 [Kuyruk başı, arka son bölümü ve baldır ya da bacaklar dışkı ile bulaşık/kirli] ve 3 [Kuyruk başı, arka son bölümü ve baldır ile bacaklar dışkı ile bulaşık/kirli] olarak değerlendirmede bulunuldu. Gizli temizlik skorlama sistemi önceden tanımlandığı hali ile (29,30) değerlendirildi.

2.4. İstatistiksel Analizler

Tüm istatistiksel analizler SPSS 29.0 (IBM, Amerika) kullanılarak gerçekleştirildi. Üç gruptaki (rotavirüsle monoenfekte, rotavirüsle koenfekte ve sağlıklı) zonulin düzeylerinin normalliği, Shapiro-Wilk testi kullanılarak değerlendirildi. Verilerin normal dağılım göstermemesi üzerine parametrik olmayan yöntemler uygulandı. Üç grup arasındaki zonulin düzeylerini karşılaştırmak için, Kruskal-Wallis ANOVA testi ile gerçekleştirildi. Post-hoc çiftler halinde karşılaştırmalar, Dunn testi kullanılarak gerçekleştirildi ve Bonferroni düzeltmesi kullanılarak çoklu karşılaştırmaları gerçekleştirmek için uygulandı.

Bu karşılaştırmalardan elde edilen p değerleri, Bonferroni yöntemi ile çoklu test için ayarlandı. Sonuçlar $p < 0,05$ 'te istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

3. Bulgular

İşletmede sadece Holştayn buzağılar yer almakta idi. Dışkı kıvamı 3'lü puantaj sistemi dahilinde değerlendirildiğinde mono-enfekte grupta 1-3 arası değişim gözlemlenirken (Şekil 2), ko-enfekte grupta skorların 2 ile 3 bandında seyrettiği tespit edildi [dışkı skoru ≥ 2 -3 olan buzağılar diyareik (28)]. Sağlıklı kontrol grubunda dışkı skorları 0 idi. Gizli temizlik skorları açısından yapılan değerlendirmede mono-infekte grupta 1 ile 2, ko-infekte grupta 2 ile 3 arasında skorlar değişmekte idi. Tablo 1'de serum zonulin seviyeleri (ng/mL) ortalama $\pm$ standart hata gösterildiği üzere rotavirüs ile mono-infekte buzağılarda 41.59 ± 6.41 , ko-infekte buzağılarda 61.61 ± 12.42 olarak belirlenirken, kontrol grubuna) 19.25 ± 6.41 göre anlamlı farklar istatistiksel olarak belirgin şekilde saptandı ($p=0.000$) (Tablo 1, Şekil 3).

Tablo 1. Rotavirüs ile infekte ve sağlıklı buzağılarda serum zonulin seviyeleri (ng/mL)

Grup	Ortalama	Standart Sapma
Rotavirüs ile monoinfekte (n=10)	41.59 ^a	6.41
Rotavirüs ile ko-infekte (n=8)	61.61 ^b	12.42
Sağlıklı (n=7)	19.25 ^c	5.52

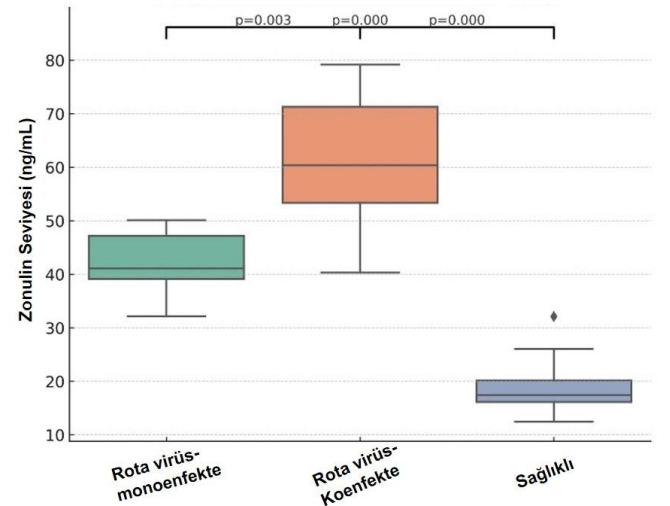
a,b,c: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır ($p=0.000$).



Şekil 1. Rotavirüs ile mono-enfekte buzağı (a) ve giardiasis ile cryptosporidiosis ile ko-enfeksiyonu gösteren test kiti (b)



Şekil 2. Çalışmaya dahil edilen buzağılarda dışkı kıvamlarına (skorlarına) ait görseller. a) skor 1, b) 2 ve c) 3. Aynı olgularda gizli temizlik skorları yine sırası ile 2, 2 ve 3 olarak tespit edildi.



Şekil 3. Rotavirüs ile mono- ya da ko-enfekte buzağılarda zonulin seviyelerini gösteren kutu grafiği.

4. Tartışma

Bağırsak geçirgenliği, birçok faktör tarafından değiştirilebilir. Farklı araştırmalar, klinik koşullar arasında bağırsak geçirgenliği değişikliklerinin (örneğin gıda alerjisi ya da intoleransı, otoimmünite, nonsteroid anti-inflamatuar kullanımı, IgA ile bağlantılı nefropati ve enfeksiyöz hastalıkları ile malabsorpsiyon vb.) artan bağırsak geçirgenliği, permeabilite ile ilişkilendirildiğini bildirmektedirler (31-35). Bu çalışmada, bağırsak geçirgenliğini tespit etmek amacıyla serum zonulin seviyelerinin tespiti mümkün kılındı. Bağırsak epitelinin makro düzeyde faaliyetleri, çözelti ve sıvı değişikliklerinin korunması sayesinde besin emilimi ile birlikte bağırsakla ilişkili lenfoid dokusu ve nöroendokrin ağ ile ilişkisine dayanmaktadır. İlaven çevresel antijenlerin bağırsak lümeninden submukoza geçişi düzenlenmektedir (36,37).

Önerilen hipotez, mukozal bariyerin bozulması ile makromoleküllerin geçişine neden olarak bunun sonucunda yerel/sistemik inflamasyon ve bağışıklık tepkisi oluşturduğunu içermektedir ki; tüm bunlar "sızdıran bağırsak" olarak adlandırılmıştır (38). Alic Ural (27) ilgili araştırmada, kanıtlarla desteklenen (giardiazisli ishal gösteren buzağılarda yüksek zonulin seviyeleri) sızdıran bağırsak varlığının ve (bağırsak geçirgenliğini), veteriner hekimler tarafından tedavi protokollerini değiştirebilecek sonuçlar olarak dikkate alınması gerektiğini bildirmiştir. Nitekim bu çalışmada tablo 1'de gösterildiği hali ile ortalama serum zonulin seviyeleri (ng/mL) rotavirüs ile mono-infekte buzağılarda 41.59 ± 6.41 (35-48), ko-infekte buzağılarda 61.61 ± 12.42 (48-74) ng/ml seviyelerinde belirlenmiş, sağlık kontrollerine kıyasla anlamlı değişim ($p=0.000$) gösterdiği ve bağırsak geçirgenliğine ilişkin olarak intestinal permeabilite artışına delalet olduğu düşünülmüştür.

Mide öncesi fermentasyon nişinden gelen yüksek mikrobiyal antijenlere maruz kalan geniş getiren hayvanlar arasında doğru bağırsak bariyeri işlevselliğinin önemi artmıştır (39). Bağırsak sağlığının hayvan üretkenliği ve refahı üzerindeki ağırlığına dair çarpıcı kanıtlar son dönemde fark edilmiştir. Güncellenmiş yönetim koşullarıyla birlikte implante edilen farklı bileşenler, hayvanların bağırsak sağlığında, bariyer işlevini de içerecek şekilde değişikliklere neden olabilir ve bağırsağın sızdırmasına neden olabilir. Ruminantlar arasında buna yönelik faktörler arasında ısı stresi, rumen asidozu, sütten kesme, azalan yem alımı ve erken laktasyondaki süt ineklerinde geçiş dönemi yer alır (22, 23, 40-49). Öte yandan, sızdıran bağırsaktan sorumlu nedenleri açıklığa kavuşturmak kolay değildir çünkü faktörler azalmış bağırsak bariyeri bütünlüğüne katkıda bulunarak azalan diğer ilgili dokuların metabolizmasını ve bağışıklık tepkisini etkileyebilir (46). Bu şaşırtıcı faktörlere örnek olarak süt ineklerinde doğum öncesi dönem ve ısı stresi gösterilebilir ki; 2'si de yeni birer baskın fizyolojik durumu desteklemek için önemli homeoretik adaptasyonlarla refakatçidir (40). Ağustos 2021'de gerçekleştirilen önceki bir çalışmada (%36 nem ile 41.1°C) ısı stresine maruz kalan buzağılarda serum zonulin seviyeleri ELISA ile değerlendirildi. Serum zonulin (ng/mL) düzeyleri gece yarısı saat 00.00'da (60.07 ± 21.20), gün ortası ise saat 12.00'de (34.60 ± 10.90) yükselmişti ($p=0.018$). Son sözü edilen ilgili çalışmada (22), yüksek zonulin düzeyleri, ısı stresi ile ilişkili olarak yüksek bağırsak geçirgenliği ile birlikte bağırsak bariyerinin bozulduğunu belirlemektedir (22). Bir başka çalışma ısı stresinin bağırsak bariyerinde işlev bozukluğuna neden olduğu hipotezini içermekte idi. İlgili, Aydın'da yazın yüksek sıcaklık koşullarında barındırılan Holştayn süt ineklerinden ($n=7$, 2-5 yaş) serum zonulin düzeyinin tespiti için alınan kan örneklerinde serum zonulin seviyelerinin önemli ölçüde ($p=0.012$) değiştiği tespit edilmiştir (saat 12:00 ve 00:00'da, sırasıyla 44°C ve 31°C sıcaklık kayıtları). Son sözü edilen araştırmada ısı stresi ineklerde bağırsak bütünlüğünü olumsuz yönde etkilemiştir

(23). İshalli giardia pozitif buzağılarda ($n=11$) serum zonulin konsantrasyonlarının daha yüksek ($p<0.001$) olduğunu ortaya konulmuş, [sağlıklı olanlarla ($n=11$) karşılaştırıldığında (63.35 ± 3.73 ng/mL'ye karşı 34.94 ± 3.72 ng/mL)], sahadaki veteriner hekimler için sızdıran bağırsak ve artmış olan bağırsak geçirgenliğinin dikkate alınma gerektiği bildirilmiştir (27). Karşılaştırmalı olarak bu çalışmada özellikle de rotavirüs ile ko-infekte buzağılarda bağırsak geçirgenliğinin sağlıklı kontrol ya da rotavirüs ile mono-infekte olanlara da kıyasla daha da arttığının belirlendiği muhakkaktır.

Önceki bir araştırmada doğumdan itibaren 21 günlük yaşa kadar takip edilen 76 Holştayn buzağıdan, özefageal tüp ile doğumu müteakip 2 saat içerisinde 4 L maternal kolostrum verilmesine karşı ardışık 3 gün boyunca fekal skorları ≥ 3 olanlar ishalleri olarak kabul edilmiştir. Aynı buzağılarda 0., 7., 14. ve 21. günlerde 2 şeker probu ile (laktüloz ve d-mannitol) yüklemesi ile intestinal permeabilite ölçülmüştür. İshalleri buzağılarda, sağlıklı kontrollerine kıyasla ilk 21 günde serum laktüloz konsantrasyonlarının daha yüksek seyretmesi artan intestinal permeabiliteye yorumlanmıştır (50). Bu araştırmada her ne kadar şeker problemleri ile yükleme planlansa da bütçe yetersizliği nedeniyle askıya alınmıştır. Ancak bir sonraki çalışmada buna yönelik girişimde bulunularak serum zonulin seviyelerindeki değişim ile korelasyon içerisinde olup olmadığı araştırılacaktır.

5. Sonuç

Sonuç olarak rotavirüs ile mono- ya da ko-enfekte buzağılarda geçirgen bağırsak sendromunun ve muhtemel intestinal permeabilite artışlarının dikkate alınması gerekliliği söylenebilir. Rotavirüs ile gerek mono- gerekse ko-enfekte buzağılarda serum zonulin seviyelerindeki artışların dikkate alınması en azından saha koşullarında veteriner hekimler için sağaltım protokollerinde değişim sağlayabilir. Geçirgen bağırsak sendromu ve intestinal permeabilite artışına yönelik olarak veteriner hekim kontrolünde probiyotik ve nutrasötik tercihleri ara sıkı bağlantı noktalarının düzensizliklerinin, geçirgenlik artışının durdurulması, mikrobiyom odaklı girişimler ve intestinal epiteliyal hücrelerin ihtiyacı olan immonutrisyonel bileşenlerin verilmesi ancak böyle gündeme gelebilecektir.

Kaynaklar

1. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirüs infection. Infection and Drug Resistance, 2017; 3: 17083.
2. Hagbom M, Sharma S, Lundgren O, Svensson L. Towards a human rotavirüs disease model. Infection and Drug Resistance, 2012; 2(4): 408-18.
3. Svensson D, Desselberger U, Estes MK, Greenberg HB, editors. Viral gastroenteritis: molecular epidemiology and pathogenesis. London, UK: Elsevier; 2016.

4. Johansen K, Stintzing G, Magnusson KE, Sundqvist T, Jalil F, Murtaza A, et al. Intestinal permeability assessed with polyethylene glycols in children with diarrhea due to rotavirus and common bacterial pathogens in a developing community. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 1989; 9(3): 307-313.
5. Serrander R, Magnusson KE, Sundqvist T. Acute infections with *Giardia lamblia* and rotavirus decrease intestinal permeability to low-molecular weight polyethylene glycols (PEG 400). *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 16(4) (1984): 339-344.
6. Stintzing G, Johansen K, Magnusson KE, Svensson L, Sundqvist T. Intestinal permeability in small children during and after rotavirus diarrhoea assessed with different-size polyethylene glycols (PEG 400 and PEG 1000). *Acta Paediatrica Scandinavica*, 1986; 75(6): 1005-1009.
7. Istrate C, Hagbom M, Vikstrom E, Magnusson KE, Svensson L. Rotavirus infection increases intestinal motility but not permeability at the onset of diarrhea. *Journal of Virology*, 2014; 88(6): 3161-3169.
8. Lahesmaa-Rantala R, Magnusson KE, Granfors K, Leino R, Sundqvist T, Toivanen A. Intestinal permeability in patients with yersinia-triggered reactive arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1991; 50(2): 91-94.
9. Serrander R, Magnusson KE, Kihlstrom E, Sundqvist T. Acute Yersinia infections in man increase intestinal permeability for low-molecular weight polyethylene glycols (PEG 400). *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 1986; 18(4): 409-413.
10. USDA. Dairy 2007 Part II: Changes in the U.S. Dairy Cattle Industry, 1991-2007. Fort Collins: USDA-APHIS-VS, CEAH; 2008. p. 57-61.
11. Roblin M, Canniere E, Barbier A, Daandels Y, Dellevoet-Groenewegen M, Pinto P, Tsousis A, Leruste H, Brainard J, Hunter PR, Follet J, Study of the economic impact of cryptosporidiosis in calves after implementing good practices to manage the disease on dairy farms in Belgium, France, and the Netherlands, *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, 2023; 4:1-7.
12. Juan RV, Ramiro G-A, Rafael A-C, Blanca PR, Alondra RR. Economic impact of mortality and morbidity from diseases in dairy calves 2019; 9:1-7. Bartels CJ, Holzhauser M, Jorritsma R, Swart WA, Lam TJ. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Infection and Drug Resistance*, 2010; 93(2-3): 162-9.
13. Izzo MM, Kirkland PD, Mohler VL, Perkins NR, Gunn AA, House JK. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Infection and Drug Resistance*, 2011; 89(5): 167-73.
14. Fenner F, MacLachlan NJ, Dubovi EJ, editors. *Fenner's Veterinary Virology*. 4th ed. Burlington: Academic Press; 2011. p. 288-90.
15. Steele AD, Geyer A, Gerdes GH. Rotavirus infections. In: Coetzer JAW, Tustin RC, editors. *Infectious Diseases of Livestock*. 2nd ed. Cape Town: Oxford University Press Southern Africa; 2004. p. 1256-64.
16. Ghosh S, Varghese V, Sinha M, Kobayashi N, Naik TN, et al. Evidence for interstate transmission and increase in prevalence of bovine group B rotavirus strains with a novel VP7 genotype among diarrhoeic calves in Eastern and Northern states of India. *Epidemiology and Infection*, 2007; 135(8): 1324-1330.
17. Tsunemitsu H, Jiang B, Saif LJ. Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992; 30(9): 2129-2134.
18. Dhama K, Chauhan RS, Mahendran M, Malik SV. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Veterinary Research Communications*, 2009; 33(1): 1-23.
19. Martella V, Bányai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology*, 2010; 140(3-4): 246-255.
20. Aliç Ural D, Ural K. Zonulin as a preliminary biomarker of lung permeability among diseased calves: Cohort study. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 2023; 54(4): 601-607.
21. Aliç Ural D, Erdoğan S, Erdoğan H, Ural K. Heat stress, intestinal barrier disruption, and calves: multidisciplinary perspective field study. *Journal of Advanced Veterinary and Biomedical Sciences and Technologies*, 2021; 6(3): 265-269.
22. Aliç Ural D, Ural K, Erdoğan H, Erdoğan S. Alterations in gut integrity due to heat stress among dairy cattle of Aydin city: analytical interpretation of zonulin levels within repetitive measurements. *International Journal of*: 10.34188/ijvar.2021.4.3.111.
23. Aliç Ural D. Heat Stress and Seasonal Dissipation of Circulating Zonulin Levels Among Calves in Aydın Region. *International Journal of Veterinary and Animal Research*, 2022; 5(2): 47-49.
24. Aliç Ural D. Serum Zonulin Levels and Fecal Scoring as Probable Early Predictor of Intestinal Inflammation Among Calves with Diarrhea: Cohort Study. *Turkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 2023; 14(1): 18-21.
25. Aliç Ural D. Zonulin as a noninvasive selected biomarker of gut barrier function identify and debug calves suffering from diarrhea. *International Journal of Veterinary and Animal Research*, 2022; 5(3): 159-161.
26. Aliç Ural D. Leaky gut and *Giardia duodenalis* infection associated serum zonulin levels among calves: randomized clinical study. *Turkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 2022; 13(2): 1-5.
27. McGuirk SM. Disease management of dairy calves and heifers. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2008; 24(1): 139-153.
28. Panivivat R, Kegley EB, Pennington JA, Kellogg DW, Krumpelman SL. Growth performance and health of dairy calves bedded with different types of materials. *Journal of Dairy Science*, 2004; 87(11): 3736-3745.
29. Sutherland MA, Worth GM, Stewart M. The effect of rearing substrate and space allowance on the behavior and physiology of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 2014; 97(7): 4455-4463.
30. Forget P, Sodoyez-Goffaux F, Zappitelli A. Permeability of the small intestine to (⁵¹Cr) EDTA in children with acute gastroenteritis or eczema. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 1985; 4(3): 393-396.
31. Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology*, 1995; 108(5): 1566-1581.
32. Davin JC, Forget P, Mahieu PR. Increased intestinal permeability to (⁵¹Cr) EDTA is correlated with IgA immune complex-plasma levels in children with IgA-associated nephropathies. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 1988; 77(1): 118-124.

33. Ford RP, Menzies IS, Phillips AD, Walker-Smith JA, Turner MW. Intestinal sugar permeability: relationship to diarrhoeal disease and small bowel morphology. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 1985; 4(4): 568-574.
34. Cook GC, Menzies IS. Intestinal absorption and unmediated permeation of sugars in post-infective tropical malabsorption (tropical sprue). *Digestion*, 1986; 33(2): 109-116.
35. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiological Reviews*, 2011; 91(1): 151-175.
36. Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2013; 11(9): 1075-1083.
37. Ajamian M, Steer D, Rosella G, Gibson PR. Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: may not be what it seems. *PLoS One*, 2019; 14(1): e0210728.
38. Mani V, Weber TE, Baumgard LH, Gabler NK. Growth and development symposium: endotoxin, inflammation, and intestinal function in livestock. *Journal of Animal Science*, 2012; 90(5): 1452-1465.
39. Baumgard LH, Rhoads RP Jr. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2013; 1: 311-337.
40. Pearce SC, Mani V, Weber TE, Rhoads RP, Patience JF, Baumgard LH, et al. Heat stress and reduced plane of nutrition decreases intestinal integrity and function in pigs. *Journal of Animal Science*, 2013; 91(11): 5183-5193.
41. Emmanuel DG, Madsen KL, Churchill TA, Dunn SM, Ametaj BN. Acidosis and lipopolysaccharide from *Escherichia coli* B:055 cause hyperpermeability of rumen and colon tissues. *Journal of Dairy Science*, 2007; 90(12): 5552-5557.
42. Khafipour E, Krause DO, Plaizier JC. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *Journal of Dairy Science*, 2009; 92(3): 1060-1070.
43. Minuti A, Ahmed S, Trevisi E, Piccioli-Cappelli F, Bertoni G, Jahan N, et al. Experimental acute rumen acidosis in sheep: consequences on clinical, rumen, and gastrointestinal permeability conditions and blood chemistry. *Journal of Animal Science*, 2014; 92(9): 3966-3977.
44. Moeser AJ, Klok CV, Ryan KA, Wooten JG, Little D, Cook VL, et al. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2007; 292(1): G173-G181.
45. Kvidera SK, Horst EA, Abuajamieh M, Mayorga EJ, Fernandez MV, Baumgard LH. Glucose requirements of an activated immune system in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 2017; 100(3): 2360-2374.
46. Wood KM, Palmer SI, Steele MA, Metcalf JA, Penner GB. The influence of age and weaning on permeability of the gastrointestinal tract in Holstein bull calves. *Journal of Dairy Science*, 2015; 98(10): 7226-7237.
47. Zhang S, Albornozi RI, Aschenbach JR, Barreda DR, Penner GB. Short-term feed restriction impairs the absorptive function of the reticulo-rumen and total tract barrier function in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 2013; 91(4): 1685-1695.
48. Abuajamieh M, Kvidera SK, Fernandez MV, Nayeri A, Upah NC, Nolan EA, et al. Inflammatory biomarkers are associated with ketosis in periparturient Holstein cows. *Research in Veterinary Science*, 2016; 109: 81-85.
49. Araujo G, Yunta C, Terré M, Mereu A, Ipharraguerre I, Bach A. Intestinal permeability and incidence of diarrhea in newborn calves. *Journal of Dairy Science*, 2015; 98(10): 7309-7317.



Sultan ve Hürmetçi Sazlıklarından Belirli Gıda Patojenlerine Karşı İzole Edilen Litik Fajların Fenotipik Karakterizasyonu

Nurhan ERTAŞ ONMAZ ¹ Yasin ÖZKAYA ² Rümeyza Nur Karakuş ²

¹ Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Veterinerlik Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri/Türkiye

² Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri/Türkiye

◆ Geliş Tarihi/Received: 29.04.2025

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 30.05.2025

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2025

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Ertas-Onmaz N, Özkaya Y ve Karakuş RN. Sultan ve Hürmetçi Sazlıklarından Belirli Gıda Patojenlerine Karşı İzole Edilen Litik Fajların Fenotipik Karakterizasyonu. Bozok Vet Sci (2025) 6, (1):26-34.

Özet: Bu çalışmada, Sultan ve Hürmetçi sazlıklarından spesifik gıda patojenlerine karşı litik bakteriyofajların izole edilmesi, fenotipik ve biyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Bu kapsamda, toplanan su örnekleri; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerine özgü litik fajların izolasyonu amacıyla zenginleştirildi. Faj varlığı spot test yöntemiyle ön değerlendirmeye tabi tutuldu ve pozitif sonuç veren örnekler çift tabaka agar yöntemiyle saflaştırıldı. İzole edilen litik fajların optimal enfeksiyon çokluğu (MOI) değerleri, adsorpsiyon kinetikleri ve tek aşamalı büyüme eğrileri çift tabaka agar yöntemiyle; konak spektrumları ile çevresel stabiliteyi ise spot test yöntemiyle karakterize edildi. Çalışmada, *L. monocytogenes* hariç diğer test bakterilerine karşı çapları 1-3 mm arasında değişen toplam 40 litik faj izole edildi. Elde edilen fajların titreleri 10^9 - 10^{10} pfu/mL arasında bulundu, tüm faj izolatları 0.1-100 MOI seviyelerinde bakteriyel büyümeyi inhibe etti ve 1 MOI düzeyinde en yüksek çoğalma gözlemlendi. Fajların adsorpsiyon süreleri 15-20 dakika, latent periyotları 15-25 dakika ve lizis süreleri 20-30 dakika arasında değişirken, patlama boyutlarının 100-120 pfu/cfu arasında olduğu belirlendi. İzole edilen fajların, pH 3.0-9.0 aralığında ve 50 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda stabiliteyi korudukları gözlemlendi. Ayrıca, izole edilen fajların 4°C'de altı ay boyunca aktiviteyi koruduğu ve yalnızca hedef bakterilere karşı litik etkinlik göstererek yüksek konak özgüllüğü sergilediği tespit edildi. Sonuç olarak, çalışmada sazlıklardan izole edilen fajlar, geniş litik spektrumları, yüksek özgüllükleri ve çevresel koşullara karşı gösterdikleri stabilite özellikleri ile biyokontrol ve terapötik uygulamalarda kullanılabilecek ajan adayları olabilecekleri gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyofaj, litik aktivite, çevresel stabilite, konak spektrumu, gıda kaynaklı patojenler, Sultan ve Hürmetçi Sazlığı

Phenotypic Characterization of Lytic Phages Targeting Specific Food Pathogens Isolated from Sultan and Hürmetçi Marshes

Abstract: This study aimed to isolate lytic bacteriophages against specific foodborne pathogens from the Sultan and Hürmetçi marshes and to evaluate their phenotypic and biological characteristics. For this purpose, water samples collected from the marshes were enriched for the isolation of lytic phages specific to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The presence of phages was assessed using the spot test, and positive samples were subsequently purified through the double-layer agar method. The optimal multiplicity of infection (MOI) values, adsorption kinetics, and one-step growth curves of the isolated lytic phages were characterized using the double-layer agar method, while their host range and environmental stability were evaluated using the spot test method. A total of 40 lytic phages were isolated against all test bacteria except *L. monocytogenes*, producing plaques with diameters ranging from 1 to 3 mm. The phage titers ranged between 10^9 and 10^{10} pfu/mL, and all phage isolates inhibited bacterial growth at MOI levels between 0.1 and 100, with the highest proliferation observed at an MOI of 1. The adsorption times of the phages ranged from 15 to 20 minutes, latent periods from 15 to 25 minutes, and lysis durations from 20 to 30 minutes, while their burst sizes were determined to be between 100 and 120 pfu/cfu. The isolated phages remained stable across a pH range of 3.0 to 9.0 and at temperatures up to 50 °C. Additionally, the phages retained their activity after six months of storage at 4°C and exhibited lytic activity exclusively against their target bacteria, demonstrating high host specificity. In conclusion, it was shown that phages isolated from reeds in the study could be candidate agents that can be used in biocontrol and therapeutic applications with their broad lytic spectrum, high specificity and stability against environmental conditions.

Keywords: Bacteriophage, lytic activity, environmental stability, host range, foodborne pathogens, Sultan and Hürmetçi Marshes

1. Giriş

Antibiyotiklerin klinik, veterinerlik, hayvancılık, tarım ve gıda işleme alanlarında uzun süreli ve yaygın kullanımı bu ajanların etkinliğini ciddi biçimde azaltmıştır. Antibiyotik direnç genlerinin varlığı ve bu genlerin yatay gen transferi yoluyla yayılabilme yetisi, patojen mikroorganizmaların

özellikle hastane ve diğer klinik ortamlarda adaptif avantaj kazanmasına neden olmuştur (1). Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine yönelik araştırmaların neredeyse durma noktasına gelmesi, çoklu ilaç dirençli (MDR) bakteri suşlarının hızla yaygınlaşmasına neden olmakta; bu durum, küresel düzeyde ciddi bir halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), antibiyotik dirençli enfeksiyonların neden olduğu ölümlerin giderek arttığını ve bu sayının 2050 yılına kadar yıllık 10 milyona ulaşarak kanserden daha fazla ölüme yol açabileceğini öngörmektedir (2). Bu nedenle, DSÖ, araştırmacıları öncelikli antibiyotik dirençli enfeksiyonları tedavi etmek için yenilikçi antibakteriyel yaklaşımlar tasarlamayı önermiştir (3). Bakteriyofajlar, bakterileri spesifik olarak enfekte eden ve onları lizis yoluyla ortadan kaldıran doğal biyolojik ajanlardır; bu yönleriyle geleneksel olarak bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaları önerilmiştir. Ancak sonraki on yıllarda antibiyotiklerin kolay erişilebilirliği ve büyük ölçekte kullanımı, bakteriyofajların tedavi amaçlı kullanımını gölgede bırakmıştır. Modern tıpta antibiyotikler, enfeksiyon hastalıklarının yönetiminde temel bir araç haline gelmiştir; ancak mevcut anti-enfektif tedavi seçeneklerinin hızla azalması, küresel sağlık açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bu bağlamda, bilim insanları ve klinisyenler bakteriyofaj uygulamalarındaki gelişmeleri umut verici ve uygulanabilir alternatifler olarak değerlendirmektedir (1,4). Konak özgüllüğü, kendi kendine çoğalabilme kapasitesi, düşük toksisite ve mikrobiyotayı etkilememe gibi özellikleri sayesinde faj terapisi, antibiyotiklere karşı umut vadeden bir alternatif tedavi stratejisi olarak değerlendirilmektedir (5). Bakteriyofajlar; bakterilerin tespiti, kontrolü ve eliminasyonu amacıyla, tedavi, gıda koruma, biyosanitasyon uygulamaları ile spesifik sensörlerin tasarımı gibi çeşitli yöntem ve alanlarda etkili bir şekilde kullanılabilir (6,7). Bakteriyofajlar, çeşitli ekosistemlerde yaygın olarak bulunan ve yalnızca belirli bakteri türlerini enfekte edebilen bakteriyel özgüllüğü yüksek virüslerdir (8,9). Konak hücrede izledikleri replikasyon stratejilerine göre litik ya da lizojenik tipte sınıflandırılmaktadır. Litik fajlar, konak hücrede hızlı çoğalarak hücre lizisine yol açarak yeni fajların çevreye yayılmasını sağlar. Lizojenik fajlar ise genomlarını konak bakterinin DNA'sına entegre eder ve hücre bölünmeleriyle birlikte kalıtsal olarak aktarılır (10). Litik fajlar, gıda kaynaklı patojenlerin çoğalmasını etkin biçimde baskılayarak, gıda endüstrisinde kontaminasyon kaynaklı kayıpların azaltılmasında önemli bir potansiyel sunmaktadır (11). Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlarda en sık karşılaşılan bakteriler; *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Brucella* spp. ve *Aeromonas* spp.'dir (12). Bakteriler; insan, hayvan ve bitki konakçıların yanı sıra toprak, su ve atmosfer gibi çeşitli çevresel habitatlarda yaygın olarak bulunmaktadır. (13). Bakterilerin bu denli yaygınlığı, onları enfekte eden bakteriyofajların da çevresel ortamlarda yüksek oranda bulunmasına neden olmaktadır. Nitekim yapılan çalışmalar, bakteriyofajların özellikle sucul ortamlarda bakterilerden yaklaşık 10 kat daha fazla sayıda bulunduğunu göstermektedir (8,9,14). Fajların, her gün okyanuslardaki bakterilerin %20-40'ını lize ettikleri

düşünüldüğünde, bakteri seviyelerini düzenleyerek ekosistemlere önemli katkılarda bulunabilirler. Bu durum, bakteriyofajların çevresel dinamiklerdeki rolü ve baskın bakterilerin döngüsünü etkileme kapasitesiyle tutarlıdır (15,16,17). Benzer şekilde, Kayseri il sınırları içerisinde yer alan Sultan Sazlığı ve Hürmetçi Sazlığı, yalnızca biyolojik çeşitliliğin korunması açısından değil, aynı zamanda bölgesel kırsal yaşamla kurdukları güçlü etkileşimler bakımından da önem taşıyan, doğal kaynak suları ve geniş mera alanlarıyla karakterize edilen sulak alanlardır (18,19). Tatlısu ekosistemlerinin önemli örneklerini oluşturan bu alanlar, zengin mikrobiyal çeşitlilikleriyle ekolojik açıdan hassas habitatlar sunmakta ve potansiyel bakteriyofaj-bakteri etkileşimlerinin araştırılması açısından dikkat çekici birer model oluşturmaktadır. Bu nedenle, Kayseri il sınırları içerisinde yer alan Sultan ve Hürmetçi sazlıklarından toplanan su örneklerinde, gıda kaynaklı patojen bakterilere karşı litik etkili bakteriyofajların izolasyonu ve bu fajların fenotipik ve biyolojik özelliklerinin (litik etkinlik, özgüllük, stabilite gibi) karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Örneklem Noktaları

Çalışma kapsamında, İç Anadolu'nun güney kesimi ile Toros Dağları'nın birbirine yaklaştığı bir konumda, Orta Kızılırmak Bölümü içerisinde yer alan Kayseri iline bağlı iki önemli sulak alanda örneklem gerçekleştirilmiştir. Bu alanlardan biri olan Sultan Sazlığı, yaklaşık 1000 km²'lik yüzölçümüne sahip Develi Ovası'nın güneybatısında, Develi, Yahyalı ve Yeşilhisar ilçelerinin idari sınırlarının kesişim noktasında yer almakta olup, yaklaşık 243,57 km²'lik bir alana sahiptir. Coğrafi olarak 38,33° kuzey enlemi ve 35,27° doğu boylamı koordinatlarında konumlanmaktadır (19). İkinci örneklem alanı olan Hürmetçi Sazlığı ise, Kayseri il merkezinin yaklaşık 13 km güneybatısında, Hacılar ve İncesu ilçeleri sınırları içerisinde yer almakta olup yaklaşık 95,92 km²'lik bir yüzölçümüne sahiptir. Alan, 1030–1270 metre arasında değişen rakımıyla dikkat çekerken; sulak alan kısmı yaklaşık 31 km² olarak bildirilmektedir. Coğrafi olarak 38,72° kuzey enlemi ve 35,34° doğu boylamı koordinatlarında konumlanan Hürmetçi Sazlığının güneyinde Erciyes Dağı, güneybatısında ise Sultan Sazlığı yer almaktadır (18).



Şekil 1. Çalışmada örneklemenin yapıldığı Sultan ve Hürmetçi sazlıklarının konumu

2.2. Çalışma Kapsamında Kullanılan Bakteri Kültürleri

Çalışmada, ziyaret edilen sazlıklardan farklı gıda kaynaklı patojenlere karşı faj izolasyonu amacıyla, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan *S. aureus*

ATCC 25923, *S. Typhimurium* ATCC 13311, *L. monocytogenes* RSKK 472 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *E. coli* ATCC 25922 suşları kullanıldı. Çalışma kapsamında izole edilen her bir fajın konak spektrumunu belirlemek amacı ile Tablo 1’de belirtilen fenotipik özellikleri belirtilen izolatlar kullanıldı.

Tablo 1. Fajların konak spektrumunun belirlenmesinde kullanılan test mikroorganizmaları ve fenotipik özellikleri.

Test Mikroorganizma (n, izolasyon kaynağı)	<i>E. coli</i> Fajı	<i>S. aureus</i> Fajı	<i>P. aeruginosa</i> Fajı	<i>S. Typhimurium</i> Fajı	Antibiyotik Direnci	Biyofilm Oluşumu
Konak Bakteriler*						
<i>S. aureus</i> ATCC 25923		✓				
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311				✓		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	✓					
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			✓			
Diğer Bakteriler**						
<i>E. coli</i> (5, atık su)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>E. coli</i> O157 (5, gıda)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>E. coli</i> (10, gıda)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>E. faecalis</i> (5, atık su)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>E. faecalis</i> (10, gıda)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>E. faecium</i> (10, gıda)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>S. aureus</i> (10, gıda)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
MRSA (10, insan)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>L. monocytogenes</i> (13, gıda)	✓	✓	✓	✓	MDR	+
<i>Salmonella</i> spp. (15, gıda)	✓	✓	✓	✓	MDR	+

* Çalışmada sadece faj izolasyonu amacıyla kullanılan konak bakteriler

** Fajların özgüllük ve konak spektrumunu belirlemek amacıyla kullanılan diğer test bakterileri

2.3. Su Örneklerinin Toplanması

Araştırma kapsamında Sultan Sazlığı ve Hürmetçi Sazlığında iki farklı zaman diliminde, yaklaşık birer aylık aralıklarla yapılan ziyaretlerde su örneklemeleri gerçekleştirilmiştir. Her örnekleme sırasında, kıyıya yakın yüzeyden 100’er mL steril numune kaplarına doğrudan manuel daldırma yöntemiyle toplam 10 adet su örnekleri toplandı. Numune alma işleminden önce şişeler çalışma alanındaki suyla durulanmış, ardından her bir şişeye örnekleme zamanı ve istasyon bilgilerini içeren etiketler yapıştırıldı. Toplanan su örnekleri, aynı gün içinde laboratuvara taşınarak analizi gerçekleştirilene kadar 4 °C’de muhafaza edildi.

2.4. Su Örneklerinden Faj İzolasyonu ve Saflaştırılması

Çalışma kapsamında alınan su örneklerinin 20 mL’si, kaba partiküllerini gidermek için 4.000× rpm’de 10 dk santrifüj (Gyrozen, Almanya) edildi. Daha sonra üstteki sıvı seri olarak 0,45 µm ve 0,22 µm gözenek boyutuna sahip membran filtrelerden (Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) süzüldü. Elde edilen filtrat, 20 mL 2X Luria Bertani (LB; Merck, 110285, Almanya) broth içine alındı ve her bir hedef bakteri türü (Tablo 1) için ayrı ayrı olacak şekilde, üzerine 1 mL 18 saat LB broth’ta aktifleştirilmiş konak bakteri kültürü eklendi. Daha sonra, konak bakterisi *L. monocytogenes* ve *P. aeruginosa* olan süspansiyonların 30°C’de, diğerleri ise 37°C’de 24 saat inkübasyonun ardından örnekler 4.000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlardaki hedef fajların varlığı spot test ile belirlendi. Bu amaçla, konakçı

bakteri kültüründen 100'er µL alınarak içinde 4' er mL LB yumuşak agar (%0,7 agar) içeren tüplere ilave edilerek karıştırıldı ve LB agar içeren petrilere dökülerek homojen olarak yayıldı ve petrilere kurumaya bırakıldı. Daha sonra katılaştıran agar üzerine, faj varlığı kontrol edilecek olan süpernatantlardan 10'ar µL damlatılarak daha önce belirtilen sıcaklıklarda 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası petrilere plak oluşumu açısından incelendi. Fajların varlığı doğrulandıktan sonra, saflaştırma ve zenginleştirme işlemleri yapıldı. Bu amaçla, 1 mL filtrat, 2 mL bakteri kültürü içeren 5 mL LB yumuşak agarla karıştırıldı ve LB agar üzerine yayılarak çift tabaka yöntemi ile her bir konak bakteri için belirtilen sıcaklıklarda bir gece inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda berrak zon oluşturan fajlar arasında farklı morfoloji gösteren beşe kadar şeffaf plak, steril bir filtre ucuyula saflaştırma için alınarak 1 mL fizyolojik tuzlu su içinde on kat seri dilüsyonları (10^{-1} - 10^{-9}) hazırlandı. Her bir dilüsyon, 1 mL kendi konak bakteri kültürü (yaklaşık 10^8 kob/mL) ve 3 mL LB yumuşak agar ile karıştırılarak LB agar üzerine homojen bir şekilde yayıldıktan sonra 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu işlem üç kere tekrarlandı. Son saflaştırmadan sonra, tek bir plak seçildi ve konak bakteri içeren LB broth'a aktarıldı. 37°C'de 100 rpm'de 18 saat çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültüre 100 µL kloroform eklendikten 20 dakika inkübe edildi ve ardından santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar 2 µm'lik filtreden geçirildi ve elde edilen filtrat 4°C'de stok faj olarak saklandı.

Stok fajların titreleri belirlemek için saline magnezyum (SM) tamponunda (5.8 g NaCl, 2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve 50 mL 1M Tris-HCl) 10 kat dilüsyonlar hazırlandı. Bu dilüsyonlardan 100 µL konak bakteri ile karıştırıldı. Karışım, 37°C'de 15 dakika bekletildikten sonra 3 mL yumuşak agara eklendi ve LB agar üzerine yayıldıktan sonra 37°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda oluşan plaklar sayıldı ve stok fajların titreleri aşağıda belirtilen formül kullanılarak plak oluşturan birim/mL (pfu/mL) olarak hesaplandı (20-22). Elde edilen stok fajlar kullanılmaya kadar 4°C'de saklandı.

Titre (pob/mL) = plak sayısı / seyreltme faktörü x mL cinsinden seyreltilmiş bakteriyofaj hacmi

2.5. İzole Edilen Fajların İn Vitro Karakterizasyonu

2.5.1. Optimal İnfeksiyon Çokluğu Değerinin (Multiplicity of Infection Value; MOI) Belirlenmesi

Fajların çoğalma etkinliğini belirlemek amacıyla farklı MOI oranlarında optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla, faj süspansiyonları ve log fazındaki bakteri kültürleri farklı MOI değerlerine (0.01, 0.01, 0.1, 1, 10 ve 100) göre karıştırıldı. Karışımlar 37°C'de 3,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, serbest bakteriyofajların uzaklaştırılması amacıyla süspansiyonlar $1000 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı 0.22 µm membran filtreden geçirilerek steril tüplere alındı. Elde edilen filtratlardan çift

tabaka agar yöntemi kullanılarak faj titreleri (pfu/mL) belirlendi. Farklı MOI seviyelerinde elde edilen faj titreleri karşılaştırıldı ve en yüksek faj çoğalmasının gözlemlendiği MOI değeri, optimal MOI olarak kabul edildi (23, 24).

2.5.2. Adsorpsiyon Hızlarının Belirlenmesi

Her bir faj süspansiyonuna belirlenen optimal MOI'ye göre bakteri kültürleri ilave edildikten sonra fajların konak bakterilerine adsorbe olması için 37°C'de 100 rpm'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda karışım $3000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet 5 mL LB broth ile süspanse edildikten sonra 37°C'de 100 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonun 2, 4 ve 6. saatlerinde süspansiyondan 100'er µL alınarak çift tabaka agar yöntemi ile titreleri belirlendi (20, 25).

2.5.3. Tek Aşamalı Gelişim Eğrilerinin (One Step Growth Curve) Belirlenmesi

Her bir konak bakteri kültürü (10^8 kob/mL) ve optimal MOI'deki (MOI=1) faj süspansiyonları eşit oranda (her biri 5 mL) karıştırıldı ve 37°C'de 100 rpm'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda faj-bakteri süspansiyonu $3000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra pelet 5 mL LB broth ile süspanse edilerek ve 37°C'de 100 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince, ilk 30 dakika boyunca her 5 dakikada bir ve sonraki 30 dakika boyunca her 10 dakikada bir süspansiyondan 100'er µL örnek alınarak, çift tabaka agar yöntemiyle faj titreleri belirlendi (25).

2.5.4. Konak Spektrumlarının Belirlenmesi

İzole edilen fajların konak bakterileri hariç çeşitli kaynaklardan izole edilen 30 farklı izolatlarda (Tablo 1) litik etkinlikleri spot ekim yöntemi ile belirlendi. Bu amaç ile, -20°C'de saklanan izolatların LB broth içindeki 18 saatlik kültürleri (100 µL) yumuşak LB agar (4 mL) karıştırılarak LB agar üzerine döküldü ve kurumaya bırakıldı. Daha sonra her bir faj süspansiyonundan 10 µL alınarak test izolatlarının üzerine damlatıldı ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda LB agar üzerinde plakların (berrak zon) varlığı ilgili fajın hedef bakteriye karşı litik etkinliği olarak değerlendirildi (26).

2.5.5. Fajların Stabilité Analizleri

Farklı sıcaklık ve farklı pH aralıklarının izole edilen fajların canlılığı üzerindeki etkisi analiz edildi. Bu amaç ile 10^7 pfu/mL başlangıç titresine sahip faj izolatlarının, sırasıyla farklı sıcaklıklarda (4°C, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C) ve farklı pH aralığında (pH 2-11) ayarlanmış LB broth içinde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresince 10 dakika aralıklarla örnekler alındı. Deney üç kez gerçekleştirildi. pH ve sıcaklık muamelesi sonrası fajların titresini çift tabaka agar yöntemi belirlendi (20). Aynı zamanda 4°C'de depolama süresince 6 ay boyunca ayda bir kez örnekleme yapılarak faj aktivitesi kontrol edildi.

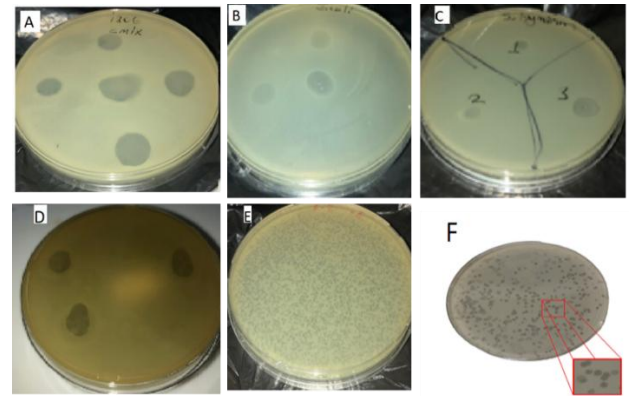
2.6. İstatistik Analiz

Fajların izole edildikleri konak bakterilere karşı 0.001-100 arası MOI seviyelerinde gösterdikleri log pfu/mL çoğalma düzeyleri ile tek aşamalı büyüme eğrisi verileri (adsorpsiyon süresi, latent periyot, lizis süresi ve patlama boyutu) için gruplar arası farklar, önce tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. ANOVA sonucu anlamlı bulunan parametrelerde gruplar arasındaki farklılıklar Tukey HSD testi ile belirlendi. Ayrıca, fajların, çeşitli kaynaklardan elde edilen test bakterilerine karşı gösterdiği litik aktivitenin türlere göre dağılımı Fisher's Exact Test ile analiz edildi. $p < 0.05$ olan tüm değişkenler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

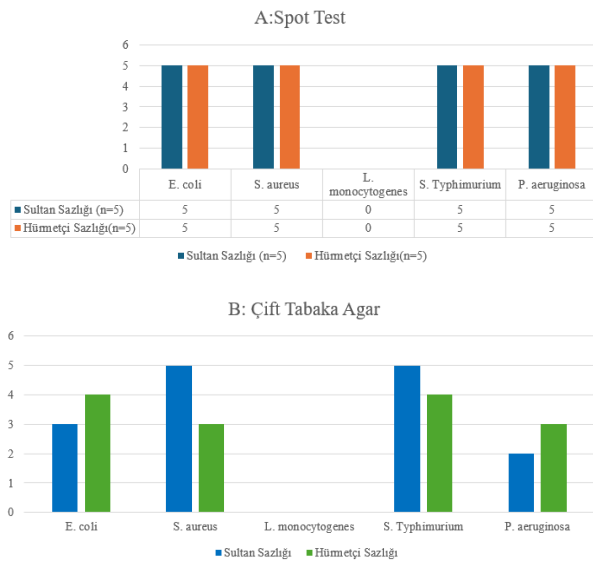
Bulgular

Sazlıklardan alınan 10 adet su örneği ile gerçekleştirilen spot testlerde, *L. monocytogenes* dışındaki tüm konak bakterilere karşı 10-15 mm çap aralığında toplam 40 faj plağı gözlemlenmiştir. Çift tabaka agar yönteminde ise bu plakların 24'ü, fajların konak bakteriler üzerinde belirgin litik aktivite sergilediğini gösteren, genellikle 1-3 mm çapında, yuvarlak ve net sınırlı plaklar oluşturdu (Şekil 2, Şekil 3). Tüm fajlar, test edilen 0.001-100 aralığındaki MOI seviyelerinde bakteriyel büyümeyi inhibe etmede etkili olurken, en yüksek çoğalma düzeyi ($\geq 10^8$ pfu/mL) 1 MOI'de gözlemlenmiş ve bu seviye, diğer MOI gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu durum, 1 MOI'nin in vitro koşullarda en etkili enfeksiyon oranı olduğunu göstermektedir (Şekil 4a). Buna ilaveten, konak bakterilere ait fajların adsorpsiyon süreleri *E. coli*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* ve *P. aeruginosa* için sırasıyla 15, 18, 15 ve 20 dakika olarak belirlenmiş; bu süreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Buna karşın, *S. aureus* fajının latent periyodu 15 dakika ile en kısa süreyi gösterirken, bu süre *P. aeruginosa* fajında 25 dakikaya kadar uzamıştır. *E. coli* ve *S. Typhimurium* fajları için ise latent periyot sırasıyla 18 ve 20 dakika olarak belirlenmiş ve gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Benzer şekilde, lizis süresi *S. aureus* ve *S. Typhimurium* fajlarında 20 dakika iken, *E. coli* fajında 25 dakika ve *P. aeruginosa* fajında 30 dakika olarak belirlenmiştir; bu farklılık da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Patlama boyutu, *S. aureus* fajında yaklaşık 120 pfu/cfu ile en yüksek, *P. aeruginosa* fajında ise 68 pfu/cfu ile en düşük seviyede belirlenmiştir ($p < 0.05$). *E. coli* ve *S. Typhimurium* fajları için bu değerler sırasıyla 100 ve 85 pfu/cfu olarak saptanmıştır ($p > 0.05$) (Şekil 4b). Ayrıca, izole edilen fajların tamamı 3.0 - 9.0 gibi geniş bir pH aralığında ve 50°C'ye kadar olan sıcaklıklarda analiz edilen bütün zaman periyotlarında iyi stabilite gösterdi. Fakat 50°C'de *P. aeruginosa* ve *S. aureus* fajları 20. dakikadan sonra aşamalı olarak titrelerinde azalma sergilerken, *S. Typhimurium* ve *E. coli* fajının titresi ise 30. dakikadan sonra azaldı. 50 °C'ye kadar fajların titrelerinde ortalama 1.0 log

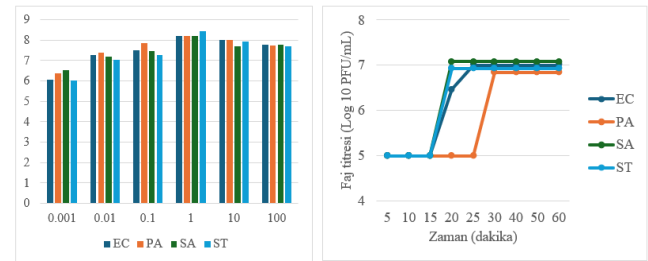
azalma belirlenirken, bu sıcaklıktan sonra ortalama 4.6 log azalma tespit edildi. Ayrıca 60 °C de hiçbir faj tespit edilmedi. Aynı şekilde, fajların titresi pH 4-7 aralığında önemli değişiklik göstermedi (ortalama 0.8 log). Bu pH değerlerinin altında ve üzerinde fajlarda titrenin 1.78-3.52 log arasında azalma saptandı. pH 10'da ise hiçbir faj tespit edilmedi. Ayrıca her bir fajın 4 °C'de altı ay boyunca saklanması süresince, spot test ile aylık yapılan kontrollerde aktivitesini koruduğu belirlendi. Yapılan spot testte, izole edilen fajların her biri yalnızca kendi hedef türüne ait, farklı kaynaklardan elde edilen izolatlar karşı litik etki göstermiş; diğer bakteri türlerine karşı herhangi bir plak oluşmamıştır. Litik aktivitenin bakteri türüne bağlı olarak farklılık göstermesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p < 0.05$) ve bu durum, fajların tür düzeyinde yüksek özgüllüğe sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 2).



Şekil 2. Çalışmada izole edilen fajlara ait plak görünüşleri. A–D: Spot testlerde faj aktivitesinin gözlemlendiği plaklar. A: *S. aureus* konak bakterisi üzerinde oluşan faj plaklarının çapı yaklaşık 10-15 mm'dir. B: *E. coli* konak bakterisi üzerinde oluşan plak çapları yaklaşık 8-12 mm'dir. C: *S. Typhimurium* konak bakterisi için üç farklı numuneye ait spotlarda gözlenen plakların çapı yaklaşık 10-12 mm'dir. D: *P. aeruginosa* konak bakterisi üzerinde gelişen plakların çapı yaklaşık 10-15 mm'dir. E–F: Çift tabaka agar yönteminde oluşan faj plaklarının genel görünümünü göstermektedir.



Şekil 3. Sultan ve Hürmetçi Sazlığından İzole Edilen Fajların Bakteriyel Konaklara Karşı Etkinliği. A: Spot Testte konak bakterilerine karşı faj aktivitesi, B: Çift tabaka agarda konak bakterilerine karşı faj aktivitesi



Şekil 4. İzole edilen fajların optimal MOI değerleri (A) ve Tek aşamalı büyüme eğrileri (B), EC: *E. coli* Faj, SA: *S. aureus* faj, ST: *S. Typhimurium* faj, PA: *P. Aeruginosa* fajı

Tablo 2. Fajların, farklı kaynaklardan izole edilen bakteri suşlarına karşı spot test yöntemiyle değerlendirilen litik etkinlik sonuçları

Test Bakterisi	İzolat sayısı	Kaynağı	Fajların test edilen izolatlara karşı litik aktivitesi			
			EC	SA	ST	PA
<i>E. coli</i>	5	Atık Su	1	0	0	0
<i>E. coli</i> O157:H7	5	Gıda	1	0	0	0
<i>E. coli</i>	10	Gıda	1	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	5	Atık Su	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	10	Gıda	0	0	0	0
<i>E. faecium</i>	10	Gıda	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	10	Gıda	0	1	0	0
MRSA	10	İnsan	0	1	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	13	Gıda	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> spp	15	Gıda	0	0	1	0
<i>P. aeruginosa</i>	10	İnsan	0	0	0	1

EC: *E. coli* faj, SA: *S. aureus* faj, ST: *S. Typhimurium* faj, PA: *P. aeruginosa* faj. “1” plak oluşumu gözlenen izolatları (litik aktivite pozitif); “0”değeri ise plak oluşumu gözlenmeyen izolatları (litik aktivite negatif) temsil etmektedir. *L. monocytogenes* izolatlarında litik etki tespit edilmemiştir. Diğer türlerde, her faj izolatu sadece kendi konak türlerine özgü olup, bu türlerin tamamına karşı litik aktivite göstermiştir.

Tartışma ve sonuç

Bakteriyofajlar, mikrobiyal toplulukların yapısını şekillendirme ve mikrobiyal çeşitliliği etkileme kapasiteleriyle doğada önemli bir ekolojik role sahiptir (27). Özellikle antibiyotik direncinin küresel ölçekte hızla yayılması, bu virüsleri hem tedavi hem de biyokontrol ve tanı amaçlı alternatif biyolojik ajanlar olarak ön plana çıkarmaktadır (6,7). Bu çalışmada, sazlık sularından *E. coli*,

S. aureus, *S. Typhimurium* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı litik aktivite gösteren 24 faj izole edilmiştir. Benzer şekilde, literatürde de çeşitli çevresel kaynaklardan (nehir suyu, atık su ve kanalizasyon) patojenlere özgül bakteriyofajların izole edildiği bildirilmektedir (27-34). Daha önce yapılan bazı çalışmalarda, *L. monocytogenes*’e karşı litik etkili fajların özellikle atık su, kanalizasyon ve gıda kaynaklı örnekler gibi farklı çevresel kaynaklardan başarıyla izole edildiği

bildirilmiştir (35) Ancak bu çalışmada, sazlık suyu örneklerinden yapılan izolasyonlarda *L. monocytogenes*'e karşı faj elde edilememiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda bu bakterinin faj enfeksiyonuna karşı doğal direnç geliştirebildiği bildirilmektedir. Bu direnç, özellikle fajın konak hücreye bağlanmasını engelleyen yüzey reseptörlerinin kaybı veya yapısal değişimi, faj DNA'sının hücre içine girdikten sonra CRISPR-Cas sistemleri veya restriksiyon-modifikasyon sistemleriyle parçalanması, ya da abortif enfeksiyon (Abi) sistemleri gibi faj replikasyonunu baskılayan hücrel savunma mekanizmalarından kaynaklanabilmektedir (36-38). Ayrıca, *L. monocytogenes* suşları arasında faj duyarlılığında genetik çeşitliliğin yüksek olması, çevresel kaynaklardan izolasyon yapılırken faj-konak uyumunu olumsuz yönde etkileyebilir. Bu durum, çalışmada elde edilen su örneklerinin içerdiği suşların, izole edilmeye çalışılan fajlara karşı dirençli olmasıyla ilişkili olabilir. Dolayısıyla, *L. monocytogenes*'e özgü fajların elde edilememesi, yalnızca kaynakla sınırlı kalmayıp, bakteriyel fizyoloji, faj spesifikliği ve ekolojik etkileşimlerin birlikte değerlendirilmesini gerektirmektedir

Mevcut çalışmada izole edilen fajların konak özgülüğü açısından elde edilen veriler, bu fajların yalnızca hedef tür içerisindeki farklı suşlara karşı etkili olduğunu, farklı türlere karşı ise etkisiz kaldığını göstermektedir. Bu durum, izolatların tür düzeyinde yüksek özgülüğe sahip olduğunu ve hem terapötik uygulamalarda hem de biyokontrol stratejilerinde hedef odaklı kullanım için uygun adaylar olduklarını düşündürmektedir. Faj terapisinde, hedef bakteri türü içinde mümkün olduğunca çok sayıda suş enfekte edebilen ancak diğer türleri etkilemeyen fajlar tercih edilmekte; bu yaklaşım, hem enfeksiyonların daha isabetli tedavisine olanak tanımakta hem de konak mikrobiyotasının korunmasına katkı sağlamaktadır. Benzer şekilde, gıda güvenliği ve çevresel biyokontrol uygulamalarında da tür düzeyinde dar, fakat suş düzeyinde geniş konak aralığına sahip fajlar, istenmeyen bakterilerin seçici olarak elimine edilmesinde önemli avantajlar sunmaktadır (39,40).

Bakteriyofajların konak hücrelerle olan etkileşimlerinin anlaşılması, moleküler biyolojiye yönelik önemli bilgiler sunmakta ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı geliştirilecek tedavi yaklaşımlarının daha iyi kavranmasına katkı sağlamaktadır (41). Fajların başlangıç konsantrasyonu, adsorpsiyon süresi, latent periyodu, lizis süresi ve patlama boyutu; üretim süreçlerinin optimizasyonu ve uygulama stratejilerinin belirlenmesinde kritik öneme sahiptir (42,43). Bu çalışmada, izole edilen fajların konak bakterilerine adsorpsiyon süreleri arasında anlamlı fark gözlenmezken ($p>0.05$), *S. aureus* fajının latent periyodu 15 dakika ile en kısa süreyi göstermiş ve *P. aeruginosa* fajında bu süre 25 dakikaya kadar uzamıştır ($p<0.05$). Benzer şekilde, lizis süresi *S. aureus* ve *S. Typhimurium* fajlarında 20 dakika iken, *E. coli* fajında 25 dakika ve *P. aeruginosa* fajında 30 dakika

olarak belirlenmiştir ($p<0.05$). Patlama boyutu ise *S. aureus* fajında yaklaşık 120 pfu/cfu ile en yüksek değeri gösterirken, *P. aeruginosa* fajında 68 pfu/cfu ile en düşük seviyede kalmıştır ($p<0.05$). Bu farklılıklar, fajların konak hücredeki çoğalma verimliliğinin ve konak-faj etkileşimlerinin bakteriyel türler arasında önemli ölçüde değişebileceğini göstermektedir. Önceki çalışmalarda *E. coli* fajlarının latent periyotlarının 10–15 dakika, adsorpsiyon sürelerinin 20–80 dakika ve patlama boyutlarının 87–364 pfu/cfu arasında değiştiği bildirilmiştir (29, 31). Benzer şekilde, *S. aureus* fajları için latent süreler 10–25 dakika arasında, patlama boyutları ise 18–170 pfu/cfu aralığında rapor edilmiştir (20, 27). Bu çalışmada elde edilen veriler, genel olarak literatürde bildirilen aralıklarla uyumlu olmakla birlikte; latent periyot, lizis süresi ve patlama boyutu gibi temel biyolojik parametrelerde, özellikle konak bakteriye bağlı olarak bazı farklılıklar göstermiştir. Bu durum, fajların biyolojik karakteristiklerinin hem farklı bakteri türleri arasında hem de aynı türden izole edilen farklı fajlar arasında anlamlı düzeyde varyasyon gösterebildiğini düşündürmektedir. Bu biyolojik farklılıklar, fajların konak üzerindeki çoğalma stratejileri ve enfeksiyon verimliliği hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Özellikle kısa latent periyot ve yüksek patlama boyutu gösteren fajlar, hızlı replikasyon ve etkili lizis özellikleri sayesinde terapötik uygulamalarda daha avantajlı adaylar olarak değerlendirilmektedir (44).

Fajların terapötik potansiyelinin değerlendirilmesinde enfeksiyon çokluğu (MOI) değeri, hem antimikrobiyal etkinliğin sağlanması hem de dozaj optimizasyonu açısından kritik bir parametredir. Bununla birlikte, yüksek MOI uygulamaları, bakterilerde direnç gelişimini teşvik edebileceğinden bu risk göz önünde bulundurulmalıdır (20, 30, 31, 45). Çalışmamızda, fajların farklı MOI seviyelerinde (0.001–100) çoğalma düzeyleri karşılaştırıldığında, her dört faj için de 1 MOI seviyesinde anlamlı düzeyde daha yüksek log pfu/mL değerleri gözlenmiştir ($p<0.05$). Bu durum her bir bakteri hücresinin ortalama bir faj partikülü ile enfekte olduğunu göstermektedir. MOI'nin bu düzeyde tutulması, fajların kontrollü çoğalmasına olanak tanıyarak tedavi sürecinde hem etkinliği artırmakta hem de direnç gelişimini azaltma potansiyeli taşımaktadır (30, 45).

Fajların terapötik uygulamalarda ve biyokontrol amaçlı kullanımlarda etkili olabilmesi için, geniş pH ve sıcaklık aralıklarına karşı stabil olmaları ve çevresel stres faktörlerine (özellikle pH ve sıcaklık değişimleri) dayanıklı olmaları gerekmektedir (33,46). Çevresel faktörlere karşı gösterdikleri bu stabilite, fajların formülasyon güvenilirliğini artırırken, biyolojik etkinliğinin sürekliliğini de sağlar (43). Daha önce yapılan çalışmalarda, *E. coli* fajları için 5-9 pH ve 25-70°C, *S. aureus* fajları için 4-12 pH ve 40-60°C, *P. aeruginosa* fajları için ise 4-50°C aralığında stabilite bildirilmiştir (27,29,31,33,47). Benzer şekilde, bu çalışmada izole edilen fajlar, pH 3.0–9.0 aralığında ve 50 °C'ye kadar olan

sıcaklıklarda yüksek stabilite sergilemiştir. Ancak 60 °C ve üzeri sıcaklıklarda ve pH 4-7 dışındaki koşullarda etkinliklerinde belirgin azalmalar gözlemlenmiştir. Elde edilen faj izolatlarının pH ve sıcaklık stabilitesinin yüksek olması, biyokontrol ve terapötik amaçlı uygulamalarda kullanım potansiyellerini desteklemektedir. Bununla birlikte, bu çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Elde edilen veriler laboratuvar ortamında in vitro koşullarda değerlendirilmiş olup, bu sonuçların in vivo sistemlerde ve gıda endüstrisine yönelik uygulamalarda geçerliliği henüz doğrulanmamıştır. Ayrıca, izole edilen fajların biyokontrol potansiyelinin gerçek saha koşullarındaki etkinliği ile uzun süreli stabilite özellikleri bu çalışma kapsamında incelenmemiştir. Dolayısıyla, fajların gıda ürünleri üzerinde pratik uygulanabilirliğinin belirlenebilmesi için ileriye dönük saha temelli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada Sultan ve Hürmetçi sazlıklarından izole edilen litik bakteriyofajlar, hedef patojen bakterilere karşı yüksek özgüllük ve geniş litik spektrum sergilemiş; kısa latent periyotları ve yüksek patlama boyutları ile güçlü antibakteriyel etki göstermiştir. Çevresel koşullara karşı stabilite, uzun süreli etkinliklerini sürdürebilmelerine olanak tanımakta ve bu özellikleri, biyokontrol ile terapötik uygulamalarda kullanılmalarını desteklemektedir. Bununla birlikte, söz konusu fajların moleküler karakterizasyonlarının yapılması ve biyokontrol potansiyellerinin saha koşullarında veya belirli gıda model sistemlerinde (örneğin et ve süt ürünleri) test edilmesi, gelecekteki çalışmalar için önem arz etmektedir. Bu doğrultuda, özellikle kesimhane yüzeyleri, işleme ekipmanları ya da paketlenmiş et ürünleri gibi gerçek gıda üretim ortamlarında gerçekleştirilecek uygulamalı denemeler, bu fajların pratik kullanım potansiyelini değerlendirmek açısından kritik öneme sahiptir.

Kaynaklar

- Chavan R, Purandare K. Bacteriophage therapy inspired new age technologies to control antimicrobial resistance. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences* 2025; 1-22.
- O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.
- Asokan GV, Ramadhan T, Ahmed E, Sanad H. WHO global priority pathogens list: a bibliometric analysis of Medline-PubMed for knowledge mobilization to infection prevention and control practices in Bahrain. *Oman medical journal* 2019; 34(3):184.
- Egido JE, Costa AR, Aparicio-Maldonado C, Haas PJ, Brouns S.J. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS microbiology reviews* 2022; 46(1):fuab048.
- Jaglan AB, Anand T, Verma R, Vashisth M, Virmani N et al. Tracking the phage trends: a comprehensive review of applications in therapy and food production. *Frontiers in Microbiology* 2022; 13: 993990.
- Alomari MMM, Dec M, Urban-Chmiel R. Bacteriophages as an alternative method for control of zoonotic and foodborne pathogens. *Viruses* 2021; 13(12): 2348.
- Abril AG, Carrera M, Notario V, Sánchez-Pérez Á, Villa TG. The use of bacteriophages in biotechnology and recent insights into proteomics. *Antibiotics* 2022; 11(5): 653.
- Ling H, Lou X, Luo Q, He Z, Sun M et al. Recent advances in bacteriophage-based therapeutics: Insight into the post-antibiotic era. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2022; 12(12): 4348-4364.
- Jia HJ, Jia PP, Yin S, Bu LK, Yang G et al. Engineering bacteriophages for enhanced host range and efficacy: insights from bacteriophage-bacteria interactions. *Frontiers in microbiology* 2023; 14: 1172635.
- Hitchcock NM, Devesqui Gomes Nunes D, Shlach J, Valeria Saraiva Hodel K, Dantas Viana Barbosa J et al. Current clinical landscape and global potential of bacteriophage therapy. *Viruses* 2023; 15(4): 1020.
- Ge H, Fu S, Guo H, Hu M, Xu Z et al. Application and challenge of bacteriophage in the food protection. *International Journal of Food Microbiology* 2022; 380: 109872.
- Abebe E, Gugsu G, Ahmed M. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. *Journal of tropical medicine* 2020; (1): 4674235.
- Oraç A. Tarihçe Ve Gıda Mikrobiyolojisinin Gelişimi. *Gıda Mikrobiyolojisi* 2024: 1
- Nair A, Ghugare GS, Khairnar K. An appraisal of bacteriophage isolation techniques from environment. *Microbial ecology* 2022; 1-17.
- Suttle CA. Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature reviews microbiology* 2007; 5(10): 801-812.
- Puxty RJ, Millard AD. Functional ecology of bacteriophages in the environment. *Current Opinion in Microbiology* 2023; 71: 102245.
- Brown TL, Charity OJ, Adriaenssens EM. Ecological and functional roles of bacteriophages in contrasting environments: marine, terrestrial and human gut. *Current Opinion in Microbiology* 2022; 70: 102229.
- Şimşek T, Aykar S. Kayseri Hürmetçi Sazlığı'nın Mevcut Durumu Ve Turizme Konu Olma Yeterliliği. *Enderun* 2022; 6(2): 181-201.
- Sönmez ME, Somuncu M. Sultansazlığı'nın alansal değişiminin sürdürülebilirlik açısından değerlendirilmesi. *Türk Coğrafya Dergisi* 2016; (66): 1-10.
- Gungor C, Onmaz NE, Gundog DA, Yavas GT, Koskeroglu K et al. Four novel bacteriophages from slaughterhouse: Their potency on control of biofilm-forming MDR *S. aureus* in beef model. *Food Control* 2024; 156: 110146.
- Çufaoğlu G, Derinöz AN, Ayaz ND. An investigation on biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7 by a bacteriophage cocktail in pastirma. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2019; 66: 7-11.
- Stipnice L, Rezevska D, Kroica J, Racenis K. Effect of the Biopolymer Carrier on *Staphylococcus aureus* Bacteriophage Lytic Activity. *Biomolecules* 2022; 12(12): 1875.
- Khalatbari-Limaki S, Hosseinzadeh S, Shekarforoush SS, Berizi E. The morphological and biological characteristics of a virulent PI phage isolated from slaughterhouse sewage in Shiraz, Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 2020; 12(6): 616.
- Tan CW, Rukayadi Y, Hasan H, Abdul-Mutalib NA, Jambari NN, et al. Isolation and Characterization of Six Vibrio parahaemolyticus Lytic Bacteriophages from Seafood Samples. *Frontiers in Microbiology* 2021; 12: 616548.

25. Abdelsattar AS, Safwat A, Nofal R, Elsayed A, Makky S et al. Isolation and characterization of bacteriophage ZCSE6 against *Salmonella* spp.: phage application in milk. *Biologics* 2021; 1(2):164-176.
26. Chen Y, Li X, Song J, Yang D, Liu W et al. Isolation and characterization of a novel temperate bacteriophage from gut-associated *Escherichia* within black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.[Diptera: Stratiomyidae]). *Archives of Virology* 2019; 164: 2277-2284.
27. Wang J, Zhao F, Sun H, Wang Q, Zhang C et al. Isolation and characterization of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB_SauS_SA2. *AIMS microbiology* 2019; 5(3): 285.
28. Yildirim Z, Sakin T, Çoban F. Isolation of lytic bacteriophages infecting *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. *Acta Biologica Hungarica* 2018; 69(3): 350-369.
29. Litt PK, Jaroni D. Isolation and Physiomorphological Characterization of *Escherichia coli* O157: H7-Infecting Bacteriophages Recovered from Beef Cattle Operations. *International journal of microbiology* 2017; 2017(1): 7013236.
30. Huang C, Shi J, Ma W, Li Z, Wang J et al.). Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices. *Food research international* 2018; 111: 631-641
31. Sada TS, Tessema TS. Isolation and characterization of lytic bacteriophages from various sources in Addis Ababa against antimicrobial-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* strains and evaluation of their therapeutic potential. *BMC Infectious Diseases* 2024; 24(1): 310.
32. Jiang YH, Liu JQ, Zhao CY, Yu S, Sun Y et al. Isolation and genome sequencing of a novel *Pseudomonas aeruginosa* phage PA-YS35. *Current Microbiology* 2020; 77: 123-128.
33. Akreimi I, Merabishvili M, Jlidi M, Haj Brahim A, Ben Ali M et al. Isolation and characterization of lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages isolated from sewage samples from Tunisia. *Viruses* 2022; 14(11): 2339.
34. Alonso MDC, Rodríguez J, Borrego JJ. Characterization of marine bacteriophages isolated from the Alboran Sea (Western Mediterranean). *Journal of plankton research* 2022; 24(10): 1079-1087.
35. Cufaoglu G, Ayaz ND. *Listeria monocytogenes* risk associated with chicken at slaughter and biocontrol with three new bacteriophages. *Journal of Food Safety* 2019; 39(3): e12621.
36. Kim JW, Siletsky RM, Kathariou S. Host ranges of *Listeria*-specific bacteriophages from the turkey processing plant environment in the United States. *Applied and Environmental Microbiology* 2008; 74(21): 6623-6630.
37. Brown P, Chen Y, Parsons C, Brown E, Loessner MJ et al. Whole genome sequence analysis of phage-resistant *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a strains from turkey processing plants. *Pathogens* 2021; 10(2): 199.
38. Byun KH, Han SH, Choi MW, Park SH, Ha SD. Isolation, characterization, and application of bacteriophages to reduce and inhibit *Listeria monocytogenes* in celery and enoki mushroom. *Food Control* 2022; 135: 108826.
39. Hyman P. Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. *Pharmaceuticals* 2019; 12(1): 35.
40. de Jonge PA, Nobrega FL, Brouns SJ, Dutilh BE. Molecular and evolutionary determinants of bacteriophage host range. *Trends in microbiology* 2019; 27(1): 51-63.
41. Bolger-Munro M, Cheung K, Fang A, Wang L. T4 bacteriophage average burst size varies with *Escherichia coli* B23 cell culture age. *J Exp Microbiol Immunol* 2013; 17: 115-119.
42. Nabergoj D, Modic P, Podgornik A. Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate. *MicrobiologyOpen* 2018; 7(2): e00558.
43. Pradeep AN, Ramasamy S, Veniemilda JK, Kumar CV. Effect of pH & temperature variations on phage stability-a crucial prerequisite for successful phage therapy. *Int. J. Pharm. Sci. Res* 2022; 13: 5178-5182.
44. Nilsson AS. Phage therapy—constraints and possibilities. *Upsala journal of medical sciences* 2014; 119(2): 192-198.
45. Benala M, Vaiyapuri M, Visnuvinayagam S, George JC, Raveendran K et al. A revisited two-step microtiter plate assay: Optimization of in vitro multiplicity of infection (MOI) for Coliphage and Vibriophage. *Journal of Virological Methods* 2021; 294: 114177.
46. Fernández L, Gutiérrez D, García P, Rodríguez A. The perfect bacteriophage for therapeutic applications—a quick guide. *Antibiotics* 2019; 8(3): 126.
47. Mohammed-Ali MN, Jamalludeen NM. Isolation and characterization of bacteriophage against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microb Diagn* 2015; 5(213): 2161-0703.



Synthesis of Medicinal Leech (Hirudo Verbana) Saliva-Incorporated Hybrid Nanoflowers and Evaluations of Their Biological Applications

Erdal YILMAZ ¹ Fatih Doğan KOCA ¹ Ayşe DEMİRBAŞ ² İzzet Burçin SATICIOĞLU ³ Behzat ÇİMEN ⁴ İsmail ÖÇSOY ⁴

¹ Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri/Türkiye

² Erciyes Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Bölümü, İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı, Rize/Türkiye

³ Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa/Türkiye

⁴ Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri, Kayseri/Türkiye

◆ Geliş Tarihi/Received: 05.05.2025

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 15.05.2025

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2025

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Yılmaz E, Koca FD, Demirbaş A, Satıcıoğlu İB, Çimen B, Öçsoy İ. Synthesis of Medicinal Leech (Hirudo Verbana) Saliva-Incorporated Hybrid Nanoflowers and Evaluations of Their Biological Applications. Bozok Vet Sci (2025) 6, (1):***.

Abstract: In this study, medicinal leech (Hirudo verbana) saliva-incorporated nanoflower (LS-NF) was synthesized and evaluated its peroxidase mimic and antimicrobial activities at the first time. Herein, we reported the formation of medicinal leech saliva (LS)-incorporated organic-inorganic nanoflower (LS-NF) with peroxidase mimic and antimicrobial activities. The medicinal leech saliva was used as an organic component and copper ion (Cu²⁺) acted as an inorganic part in the synthesis of LS-NF. Leech saliva was obtained from medicinal leeches Hirudo verbana, contains various amino acids, and it can react with Cu²⁺ ions in phosphate buffer through its accessible amine groups to form flower-shaped structures. These LS-NFs showed quite uniform and monodispersed morphology. They were systematically characterized with SEM, FTIR, and XRD for evaluation of morphology, bond vibrations, and crystal structure, respectively. The LS-NF acted as a Fenton reagent in the presence of hydrogen peroxide (H₂O₂), then we investigated their peroxidase-like and antimicrobial activities through the Fenton reaction. It was concluded that LS-NFs can be used in various scientific and industrial applications, and also as an effective antimicrobial agent.

Keywords: Medicinal leech saliva, Hybrid nanoflower, Fenton reaction, Peroxidase-like activity, Antimicrobial activities

Tıbbi Sülük Salyası İçeren Çiçek Şekli Hibrit Nanoyapıların Sentezlenmesi Ve Biyolojik Uygulamalarda Değerlendirilmesi

Özet: Bu çalışmada tıbbi sülük (Hirudo verbana) salyası kullanılarak çiçek şekilli nano yapılar sentezlenmiş ve ilk defa peroksidaz ve antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Araştırmada, tıbbi sülük salyası (H. verbana) kullanarak organik ve inorganik çiçek şekilli nanoyapıların (LS-NF) peroksidaz ve antimikrobiyal etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Çiçek şekilli nano yapıların sentesinde sülük salyası organik bileşen olarak kullanılırken, bakır iyonları (Cu²⁺) ise inorganik bileşen olarak rol almıştır. Birçok amino asit içeren tıbbi sülük salyası fosfat tampon içindeki Cu²⁺ iyonlarının amin grupları üzerinden çiçek şekilli nano yapılar oluşturmaktadır. Bu çiçek şekilli nano yapılar oldukça düzgün ve homojen bir dağılım sergiledi. Sentezlenen bu nano yapılar morfolojik, bağ titreşimleri ve kristal yapıları bakımından SEM, FTIR ve XDR analizleri ile sistematik bir şekilde karakterize edildi. Çiçek şekilli nano yapılar (LS-NF) hidrojen peroksit (H₂O₂) varlığında bir Fenton reaktifi olarak davranmış olup, bunlar peroksidaz benzeri ve antibiyotik aktiviteler bakımından incelendi. Çalışmada, LS-NF'lerin etkili bir antimikrobiyal ajan olmalarının yanı sıra birçok bilimsel ve endüstriyel uygulamada kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tıbbi sülük salyası, Hibrit nanoçiçek, Fenton reaksiyonu, Peroksidaze benzeri aktivite, Antimikrobiyal aktiviteler

1. Introduction

The discovery of protein-inorganic hybrid nanoflower (NFs) formation with enhanced stability and catalytic activities was reported for the first time by Zare and co-workers (1). The enzyme incorporated-NFs have received great attention from researchers owing to their unique biological activities, and they have been in use for a variety of applications, including biosensor fabrication, catalysis, dye decolorization, and free-radical polymerization (2-11). Wang et al. reported how the allosteric effect and morphology influence enzymatic activities of α -amylase@CaHPO₄ NFs. In terms of

mechanism, α -amylase was first activated by binding Ca²⁺ into the allosteric site in inactive α -amylase, then amylase@CaHPO₄ NFs showing great activities and stabilities were formed with self-assembly strategy in phosphate buffer (2). Yang et al. demonstrated how to use acetylcholinesterase-based NF as an electrochemical sensor for the detection of dichlorvos via square-wave voltammetry (11). In a further study, Dadi et al. prepared horseradish peroxidase NFs@carbon nanotube (HRP-NF@CNTs) as novel hybrid nanocatalysts with in situ and post-modification procedures. While both HRP-NF@CNT showed an increase in catalytic activities, the HRP-NF@CNT prepared by post-

modification exhibited outstanding exhibited greatly enhanced peroxidase activity and stability owing to benefiting from both the HRP-NF and synergistic effect between CNT and Cu₃(PO₄)₂ crystals (6).

In addition to that, the development of dual enzyme combined NFs opened up a new avenue for multiple functions and cascade-type reactions (12-14). For instance; while Gul et al. synthesized dual enzyme-based NFs consisting of HRP and laccase for effective and simultaneous degradation of a cationic dye and an anionic azo dye, Zhu et al. developed a combination of glucose oxidase (GOx) and HRP enzymes in the NFs for quantitative detection of glucose. Simply, glucose is catalyzed by GOx to produce hydrogen peroxide (H₂O₂), then HRP used the H₂O₂ to oxidize a colorless 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) into a blue product (13, 14).

Alternative to enzyme-based NFs, researchers have developed non-enzyme-based NFs and investigate their peroxidase mimic activities in the presence of H₂O₂ through mechanism of Fenton reaction (15-22). The NFs can be formed from organic or biological molecules containing functional groups (amine, carboxyl or thiol and etc). For instance, We et al. used natural amino acids (AA) as organic components to form AA-based NFs with an intrinsic peroxidase-mimic activity (22). Aslan et al. reported ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) based NFs and utilized them as novel irrigation solutions for biofilms formed by *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* (19). To extend this concept, whole plant extracts were employed as organic parts for the synthesis of plant extract-based NFs (23-27). These plant extract-based NFs have been used for various scientific and industrial applications, including the fabrication of novel antimicrobial, catalytic, and dye-removal agents. For instance, Demirbas et al. synthesized NFs using umbilical decussate extract and investigated their peroxidase mimic, antimicrobial, and dye degradation properties against guaiacol, bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Staphylococcus aureus*) and malachite green, respectively (28).

Medicinal leeches, also known as "blood-sucking leeches" (such as *Hirudo verbana*), secrete saliva that occurs naturally in the salivary glands and has anticoagulant properties (29). It has also been reported in the literature that medicinal leeches secrete saliva containing approximately 60 different proteins (30). In this research, we synthesized leech saliva-incorporated nanoflower (LS-NF) and evaluated its peroxidase mimic and antimicrobial activities at the first time. The various characterization methods were used to elucidate the formation of the LS-NFs. All biological activities of the LS-NF were observed by the addition of H₂O₂, which relied on the Fenton reaction mechanism.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis of Leech Saliva-Incorporated Nanoflower

The medicinal leech saliva used in this study was supplied by a local company called Cansuyu Sülük (Kayseri, Türkiye), which produces *Hirudo verbana* species. The LS-NFs were synthesized by the modification of reported work (22). Briefly, a 120 mM CuSO₄ solution was freshly prepared as a stock solution, then a certain volume (the final concentration of Cu²⁺ is 0.8 Mm) of stock CuSO₄ solution was added into 10 mM phosphate buffered saline (PBS) at pH: 7.4. Leech saliva solution (the final concentration is 0.02 mg/mL) was added into above mixture, then resulting mixture was vigorously vortexed for 30 sn to provide homogeneous interaction between saliva molecules and Cu²⁺ ions. The final mixture was left undisturbed for 3 days of incubation. After incubation, the blue precipitate at the bottom reaction vial can be considered as an indication for the formation of the LS-NFs. The final product, LS-NFs, was washed with deionized water by centrifugation to remove unreacted of metal ions and saliva. The collected LS-NFs were dried in an oven at 60 C. The powder LS-NF was stored for further use.

2.2. Catalytic Activity of Leech Saliva- Incorporated Nanoflower

Briefly, LS-NFs (3 mg) were added to the solution containing H₂O₂ (22.5 mM), guaiacol (45 mM), and PBS (pH 6.8) (23). The reaction volume was manipulated to adjust the final concentrations of H₂O₂, and guaiacol to 7.5 mM and 15 mM, respectively. The oxidation of guaiacol (2-methoxyphenol) to colored 3,3-dimethoxy-4,4-diphenylquinone was recorded by measuring absorbance values at 470 nm by using a UV-Vis spectrophotometer.

2.3. Antimicrobial Activity of Leech Saliva-Incorporated Nanoflower

In terms of standard microorganisms, *Escherichia coli* (E. coli) ATCC 35218 (Gram-negative) and *Staphylococcus aureus* (S. aureus) ATCC 25923 (Gram-positive) used as bacterial strains, and *Candida albicans* (C. albicans) ATCC 10231 used as a fungus (obtained from the Erciyes University Pharmaceutical Microbiology Laboratory collection). Antimicrobial activities of free leech saliva, LS-NF with H₂O₂, LS-NF, and H₂O₂ were evaluated based on Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines via broth microdilution method.

In the antibacterial activity procedure, the bacterial cells were cultured in Mueller Hinton broth and incubated at 37 °C for 14 hrs, and their concentration was arranged to 0.5 McFarland. Each antimicrobial agent was mixed with bacterial and fungus strains, and each mixture was incubated at 37 °C for 18–24 hrs for bacteria and 48–72 hrs for fungi. All experiments were carried out in triplicate.

3. Results and Discussions

3.1. Characterization of Leech Saliva-Incorporated Nanoflower

In a typical NF synthesis procedure, Cu^{2+} ions react with phosphate ions (PO_4^{3-}) in PBS to form primary copper phosphate complexes ($\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$). Enzymes or proteins preferentially bind with Cu^{2+} through their primary amine groups in $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ complexes to create protein- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ nanocrystals as nuclei. During the incubation process, protein- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ nanocrystals formed large petals, and each petal was combined with each other to form a flower-shaped structure.

The leech saliva has many polypeptides containing packs of amino acids, so it has various available amine groups to form NFs. The LS-NFs synthesized (in PBS pH 7.4) at room temperature (RT: 25°C) have quite spherical and uniform morphology due to various available amine groups in leech saliva. The LS-NFs are well-monodispersed with diameters of $\sim 3\ \mu\text{m}$ size (Figure 1A).

The boundaries of petals in blooming structures of LS-NF were clearly observed in a magnified SEM image (Figure 1B).

The Cu^{2+} ions are considered as the cornerstone of the LS-NFs because they form primary nanocrystals $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ to form LS-NFs. However, no flower-shaped structure was formed without Cu^{2+} ions. When the Cu^{2+} ions are removed from pre-synthesized LS-NFs, the LS-NFs collapse, and no more flower-shaped morphology is seen. The presence of Cu metal in LS-NF was monitored by Energy dispersive X-ray (EDX) as shown in Figure 1C.

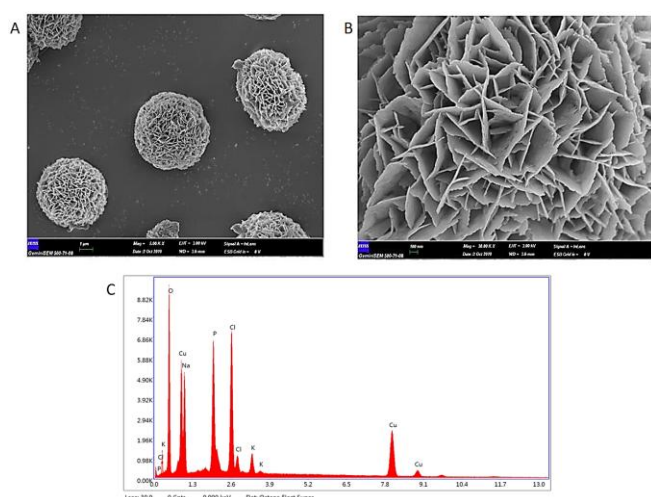


Figure 1. A) SEM image of LS-NFs with 5.00 KX magnification, B) Magnified SEM image of LS-NFs with 30.00 KX magnification. C) The Cu analysis of the LS-NF in the EDX spectrum.

The characteristic stretching and bending vibrations of leech saliva in LS-NFs were analyzed by FTIR analysis, as shown on the FTIR spectrum in Figure 2A.

The amine groups ($-\text{NH}_2$) gave the bending and stretching vibrations were recorded at $1622\ \text{cm}^{-1}$. Additionally, the peak that appeared at $1139\ \text{cm}^{-1}$ was attributed to the stretching of the C-N bond in NH_2 . The stretching vibration of hydroxyl bond ($-\text{OH}$) at $3289\ \text{cm}^{-1}$. The characteristic stretching vibration peaks of PO_4^{3-} (P-O and P=O vibrations in $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ primary crystals were seen at $1097\ \text{cm}^{-1}$ and $557\ \text{cm}^{-1}$. All characteristic stretching and bending peaks can be indications of LS-NF formation.

In addition to that, the crystal structure of LS-NF was elucidated by XRD analysis, as given in Figure 2B.

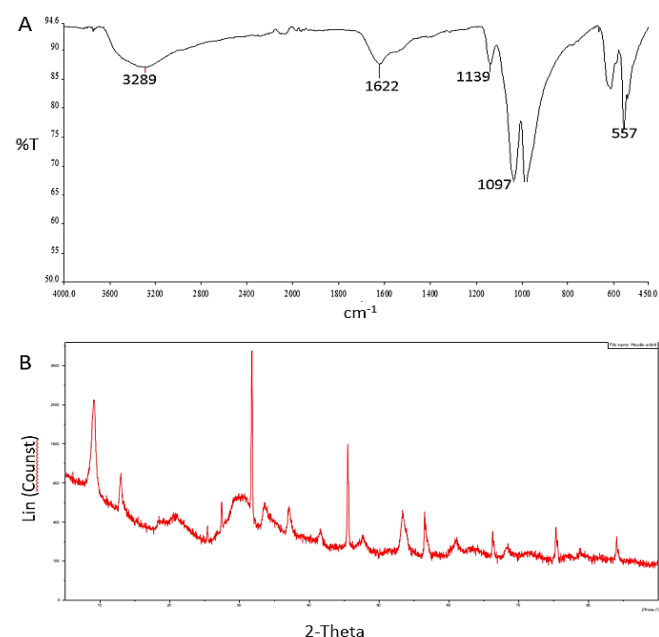


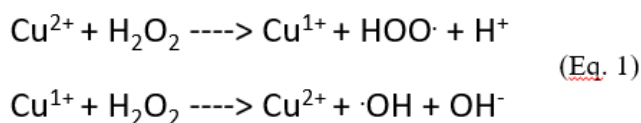
Figure 2. A) FTIR spectrum of LS-NF and B) XRD patterns of LS-NF.

Based on the XRD spectrum, almost all diffraction peaks of $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ in the LS-NFs were consistent with the standard of the JCPDS card (00-022-0548). The distinct and clear diffraction peaks in the LS-NFs were observed in XRD spectrum. The diffraction peaks positions at around $\sim 8.5^\circ$, $\sim 13^\circ$, $\sim 21^\circ$, $\sim 27^\circ$, $\sim 32^\circ$, $\sim 33^\circ$, $\sim 45^\circ$, $\sim 48^\circ$, $\sim 53^\circ$, $\sim 57^\circ$ and $\sim 68^\circ$ in the 2-theta plane. This XRD pattern of LS-NF revealed that its crystal structure is overlapped with the crystal pattern of $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (JCPDS card (00-022-0548)).

3.2. Catalytic Activity of Leech Saliva-Incorporated Nanoflower

Peroxidase-like activities of LS-NF were tested by oxidation of guaiacol. The LS-NF exhibited catalytic activity via a Fenton-like reaction mechanism in the presence of H_2O_2 . The Fenton reaction relies on the formation of Cu^{2+} and Cu^{1+} ions in the LS-NF shown in equation 1 (Eq. 1). Briefly, Cu^{2+}

ions in $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ of the-NF were reduced to Cu^{1+} by H_2O_2 , then Cu^{1+} reacted with H_2O_2 to re-create Cu^{2+} ions and to form reactive hydroxyl radical (ROS). This continuous cascade reaction produces much ROS, which causes oxidation of guaiacol used as a standard substrate.



The peroxidase-mimic activity of the LS-NF used as a Fenton reagent (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was examined towards guaiacol. The LS-NF rapidly and efficiently oxidized guaiacol to convert into an oxidized product called “3,3-dimethoxy-4,4-diphenoquinone”. The formation of the product was monitored by measurement of its absorbance peak at 470 nm via Uv-Vis spectrophotometer (Figure 3).

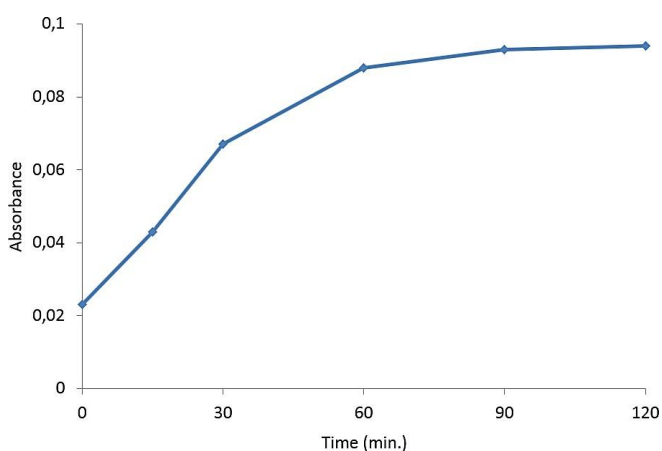


Figure 3. Peroxidase-mimic activity of LS-NF via Fenton reaction.

3.3. Antimicrobial Activity of Leech Saliva-Incorporated Nanoflower

We tested antimicrobial activities of LS-NF with and without H_2O_2 , and antimicrobial activities of the free leech saliva and H_2O_2 were used for comparison towards *E. coli*, *S. aureus*, and *C. albicans* (Figure 4).

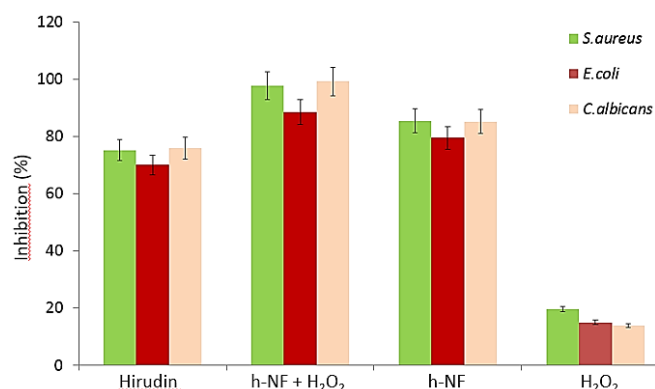


Figure 4 Antimicrobial activities of free leech saliva, LS-NF with H_2O_2 , LS-NF, and H_2O_2 .

The leech saliva in free from displayed kind of effective antimicrobial activities with ~70% inhibition for all three microorganisms. While almost ~85%, ~97%, and ~99% of *E. coli*, *S. aureus*, and *C. albicans* were respectively killed by the LS-NF in the presence of H_2O_2 , only LS-NF without H_2O_2 caused ~78%, ~82%, and ~82% inactivation for *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans*, respectively. In addition to that, the H_2O_2 solution killed around 10% of each bacterial and fungal cell.

We revealed that free leech saliva showed over mild-level antimicrobial activities; however, saliva in NF form exhibited highly effective antimicrobial activities, especially in the presence of H_2O_2 , which can be attributed to morphology and ROS production capability of the LS-NFs. The ROS produced by the LS-NF oxidizes the membrane of each cell, and cell membrane rigidity is decomposed, then eventual cell death is observed.

In conclusion, we have examined formation of medicinal leech (*Hirudo verbana*) saliva-incorporated organic-inorganic nanoflower (LS-NF) with peroxidase mimic and antimicrobial activities through the Fenton reaction. We showed that amino acid rich- leech saliva produced quiet uniform, compact and monodisperse NFs at the first time. The LS-NFs acted as Fenton reagent in the presence of H_2O_2 and generate ROS radicals which are in charge of intrinsic peroxidase-like and antimicrobial activities. We concluded that LS-NFs can be implemented in various scientific and industrial applications, and also as an effective antimicrobial agent.

Acknowledgements

This work was supported by the Erciyes University Scientific Research Projects Coordination Office, Project Number: FCD-2018-8410.

Declarations

Conflict of interest

The authors declare no competing interests.

Ethical approval

Not applicable

Consent to participate

Non applicable

Consent to publish

All authors consent to the publication of this manuscript

Reference

- Ge J, Lei J, Zare RN. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nature nanotechnology* 2012; 7: 428-432, 2012. doi: 10.1038/nnano.2012.80.

2. Wang LB, Wang YC, He R. A new nanobiocatalytic system based on allosteric effect with dramatically enhanced enzymatic performance. *Journal of American Chemical Society* 2013; 135(4): 1272-1275. doi:10.1021/ja3120136.
3. Ozaydin G, Mirioglu M, Dadi S. Investigation of the free-radical polymerization of vinyl monomers using horseradish peroxidase (HRP) nanoflowers. *Polymer Bulletin* 2025; <https://doi.org/10.1007/s00289-025-05664-z>.
4. Ozaydin G, Mirioglu M, Kaplan N: Horseradish peroxidase (HRP) nanoflowers-mediated polymerization of vinyl monomers. *Journal of Polymer Research* 2024; 31: 363, 2024. doi:10.1007/s10965-024-04217-8.
5. Gokturk E, Ocsoy İ, Turac E, Sahmetlioglu E: Horseradish peroxidase-based hybrid nanoflowers with enhanced catalytical activities for polymerization reactions of phenol derivatives. *Polymers For Advanced Technologies* 2020; 31:2371–2377. doi: 10.1002/pat.4956.
6. Dadi S, Temur N, Gul OT, Yilmaz V, Ocsoy I. In Situ Synthesis of Horseradish Peroxidase Nanoflower@Carbon Nanotube Hybrid Nanobiocatalysts with Greatly Enhanced Catalytic Activity. *Langmuir* 2023b; 39(13): 4819-4828. doi:10.1021/acs.langmuir.3c00260.
7. Dadi S, Ocsoy I. Role of pretty nanoflowers as novel versatile analytical tools for sensing in biomedical and bioanalytical applications. *Smart Medicine* 2024; 3(1): e20230040. doi:10.1002/SMMD.20230040.
8. Tran TD, Kim MI. Organic-inorganic hybrid nanoflowers as potent materials for biosensing and biocatalytic applications. *BioChip Journal* 2018; 12(4):268–279. doi: 10.1007/s13206-018-2409-7.
9. Cheon HJ, Adhikari MD, Chung M, Tran TD, Kim J, Kim MI. Magnetic Nanoparticles-Embedded Enzyme-Inorganic Hybrid Nanoflowers with Enhanced Peroxidase-Like Activity and Substrate Channeling for Glucose Biosensing. *Advanced Healthcare Materials* 2019; 8(9): e1801507. doi:10.1002/adhm.201801507.
10. Wang Q, Li X, Ren Y. Rapid and precise treatment selection for antimicrobial-resistant infection enabled by a nano-dilution SlipChip. *Biosensors and Bioelectronics* 2025; 271: 117084. doi:10.1016/j.bios.2024.117084.
11. Yang L, Zhang X, Li M, Qu L, Liu Z. Acetylcholinesterase-Cu₃(PO₄)₂ hybrid nanoflowers for electrochemical detection of dichlorvos using square-wave voltammetry. *Analytical Methods* 2022; 14(39): 3911-3920. doi:10.1039/d2ay01014c.
12. Gul OT, Ocsoy I: Co-Enzymes based nanoflowers incorporated-magnetic carbon nanotubes: A new generation nanocatalyst for superior removal of cationic and anionic dyes with great repeated use. *Environmental Technology and Innovation* 2021a; 24: 101992. doi: 10.1016/j.eti.2021.101992.
13. Gul OT, Ocsoy I. Preparation of magnetic horseradish peroxidase-laccase nanoflower for rapid and efficient dye degradation with dual mechanism and cyclic use. *Materials Letters* 2021b; 303: 130501. doi: 10.1016/j.matlet.2021.130501.
14. Zhu X, Huang J, Liu J, Zhang H, Jiang J, Yu R. A dual enzyme-inorganic hybrid nanoflower incorporated microfluidic paper-based analytic device (μPAD) biosensor for sensitive visualized detection of glucose. *Nanoscale* 2017; 9 (17): 5658-5663. doi:10.1039/c7nr00958e.
15. Koca FD, Demirezen Yilmaz D, Ertas Onmaz N, Ocsoy I. Peroxidase-like activity and antimicrobial properties of curcumin-inorganic hybrid nanostructure. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2020; 27(10): 2574-2579. doi:10.1016/j.sjbs.2020.05.025.
16. Yilmaz SG, Demirbas A, Karaagac Z, Dadi S, Celik C et al. Synthesis of taurine-Cu₃(PO₄)₂ hybrid nanoflower and their peroxidase-mimic and antimicrobial properties. *Journal of Biotechnology* 2022; 343: 96-101. doi:10.1016/j.jbiotec.2021.11.009.
17. Dadi S, Celik C, Mandal AK, Ocsoy I. Dopamine and norepinephrine assistant-synthesized nanoflowers immobilized membrane with peroxidase mimic activity for efficient detection of model substrates. *Applied Nanoscience* 2021; 11: 117–125. doi:10.1007/s13204-020-01577-7.
18. Dadi S, Cardoso MH, Mandal AK, Franco OL, Ildiz N, et al. Natural Molecule-Incorporated Magnetic Organic-Inorganic Nanoflower: Investigation of Its Dual Fenton Reaction-Dependent Enzyme-Like Catalytic Activities with Cyclic Use. *ChemistrySelect* 2023a; 8: e202300404. doi: 10.1002/slct.202300404.
19. Aslan T, Dadi Ş, Kafdag O, Temur N, Ildiz N et al. Rational design of EDTA-incorporated nanoflowers as novel and effective endodontic disinfection against biofilms. *Odontology* 2024; 112(2): 444-452. doi:10.1007/s10266-023-00857-2.
20. Dadi S, Celik C, Ocsoy I: Gallic acid nanoflower immobilized membrane with peroxidase-like activity for m-cresol detection. *Science Reports* 2020; 10(1): 16765. doi:10.1038/s41598-020-73778-7.
21. Altinkaynak C, Ildiz N, Baldemir A, Ozdemir N, Yilmaz V, et al. Synthesis of organic-inorganic hybrid nanoflowers using *Trigonella foenum-graecum* seed extract and investigation of their antimicrobial activity. *Derim* 2019; 36 (2): 159-167. doi:10.16882/derim.2019.549151.
22. Wu ZF, Wang Z, Zhang Y, Ma YL, He CY, et al. Amino acids-incorporated nanoflowers with an intrinsic peroxidase-like activity. *Science Reports* 2016; 6: 22412. doi: 10.1038/srep22412.
23. Ildiz N, Baldemir A, Altinkaynak C, Özdemir N, Yilmaz V, et al. Self assembled snowball-like hybrid nanostructures comprising *Viburnum opulus* L. extract and metal ions for antimicrobial and catalytic applications. *Enzyme and Microbial Technology* 2017;102: 60-66. doi:10.1016/j.enzmitec.2017.04.003.
24. Baldemir A, Köse NB, Ildiz N, Ilgun S, Yusufbeyoglu S, et al. Synthesis and characterization of green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) extract and its major components-based nanoflowers: a new strategy to enhance antimicrobial activity *RSC Advances* 2017; 7: 44303-44308. doi: 10.1039/C7RA07618E.
25. Baldemir Kılıç A, Ildiz N, Yusufbeyoglu S, Ocsoy I. Nanoflower synthesis formed at different pH based on *Crocus sativus* L. (Crocus stigma, saffron) extract and its major components: a new approach for enhancing antioxidant, antimicrobial and catalytic activities. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry* 2023; 55(1): 18–28. doi: 10.1080/24701556.2023.2240757.
26. Kalaycı B, Kaplan N, Mirioglu M, Dadi Ş, Ocsoy İ, et al. Investigation of Peroxidase-Like Activity of Flower-Shaped Nanobiocatalyst from *Viburnum Opulus* L. Extract on the Polymerization Reactions. *Jotcsa* 2024;11(3):1321-1328. doi: 10.18596/jotcsa.1451444.

27. Heidari N, Tarahhomi A, van der Lee A. Structural and Molecular Packing study of Three New Amidophosphoric Acid Esters and Assessment of Their Inhibiting Activity Against SARS-CoV-2 by Molecular Docking. *ChemistrySelect* 2022; 7 (29): e202201504. doi:10.1002/slct.202201504.
28. Demirbas A, Karsli B, Dadi S, Arabaci N, Koca FD, Halici MG, et al. Formation of Umbilicaria decussata (Antarctic and Turkey) Extracts Based Nanoflowers with Their Peroxidase Mimic, Dye Degradation and Antimicrobial Properties. *Chemical Biodiversity* 2023; 20(8): e202300090. doi:10.1002/cbdv.202300090.
29. Haycraft JB. On the action of a secretion obtained from the medicinal leech on the coagulation of the blood. *Proc R Soc Lond.*; 36: 478-87, 1883.
30. Baskova IP, Zavalova LL, Basanova AV, Moshkovskii SA, Zgoda VG. Protein profiling of the medicinal leech salivary gland secretion by proteomic analytical methods. *Biochemistry* 2004; 69(7):770-775. doi:10.1023/b:biry.0000040202.21965.2a.
31. Minuti A, Ahmed S, Trevisi E, Piccioli-Cappelli F, Bertoni G, Jahan N, et al. Experimental acute rumen acidosis in sheep: consequences on clinical, rumen, and gastrointestinal permeability conditions and blood chemistry. *Journal of Animal Science*, 2014; 92(9): 3966-3977.
32. Moeser AJ, Klok CV, Ryan KA, Wooten JG, Little D, Cook VL, et al. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2007; 292(1): G173-G181. Kvidera SK, Horst EA, Abuajamieh M, Mayorga EJ, Fernandez MV, Baumgard LH. Glucose requirements of an activated immune system in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 2017; 100(3): 2360-2374.
33. Wood KM, Palmer SI, Steele MA, Metcalf JA, Penner GB. The influence of age and weaning on permeability of the gastrointestinal tract in Holstein bull calves. *Journal of Dairy Science*, 2015; 98(10): 7226-7237.
34. Zhang S, Albornoz RI, Aschenbach JR, Barreda DR, Penner GB. Short-term feed restriction impairs the absorptive function of the reticulo-rumen and total tract barrier function in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 2013; 91(4): 1685-1695.
35. Abuajamieh M, Kvidera SK, Fernandez MV, Nayeri A, Upah NC, Nolan EA, et al. Inflammatory biomarkers are associated with ketosis in periparturient Holstein cows. *Research in Veterinary Science*, 2016; 109: 81-85.
36. Araujo G, Yunta C, Terré M, Mereu A, Ipharraguerre I, Bach A. Intestinal permeability and incidence of diarrhea in newborn calves. *Journal of Dairy Science*, 2015; 98(10): 7309-7317.



Nebulized Methylene Blue as an Anti-Pruritic Treatment Modality in Dogs with Atopic Dermatitis

Kerem URAL ¹ Hasan ERDOĞAN ¹ Songül ERDOĞAN ¹ Serdar PAŞA ¹ Alper SUNGUR ¹
 Tahir ÖZALP ¹ ✉

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

◆ **Geliş Tarihi/Received:** 23.05.2025 ◆ **Kabul Tarihi/Accepted:** 09.06.2025 ◆ **Yayın Tarihi/Published:** 30.06.2025

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Ural K, Erdoğan H, Erdoğan S, Paşa S, Sungur A, Özalp T. Nebulized Methylene Blue as an Anti-Pruritic Treatment Modality in Dogs with Atopic Dermatitis. Bozok Vet Sci (2025) 6, (1):41-45.

Abstract: Canine atopic dermatitis (cAD) is a chronic inflammatory dermatological disorder in dogs, primarily characterized by pruritus. Conventional treatment modalities involve topical and systemic agents among allergen-specific immunotherapy (ASIT); however, their effectiveness varies, and potential adverse effects necessitate alternative therapeutic approaches. Methylene blue (MB) is a cationic photosensitizer with antimicrobial and neuromodulatory effects, previously shown to alleviate pruritus in human medicine by blocking peripheral nerve endings. This study aimed to evaluate the therapeutic capability of nebulized MB in reducing pruritus severity in dogs with AD. For this propose a total of 13 dogs diagnosed with AD without any treatment for at least three weeks were enrolled to the study. All cases were assessed using the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI-04) and Visual Analog Scale (VAS). MB was administered via nebulization in a single session, and pruritus scores were recorded on days 2, 4, 6, 8, and 10. The results demonstrated a marked reduction in pruritus scores following MB administration, with the most significant improvements observed on days 4, 6, and 8. no adverse effects were noted throughout the study. Given its neuro-modulatory and anti-inflammatory properties, MB appears to be a promising alternative approach for the management of pruritus associated with AD in dogs. In conclusion nebulized MB is a safe and effective treatment modality for pruritus management in cAD. These findings warrant further controlled studies to elucidate the underlying mechanisms and long-term therapeutic potential of MB in veterinary dermatology.

Keywords: Methylene blue, canine atopic dermatitis, pruritus, nebulization, veterinary dermatology

Detection of Serum Zonulin Levels in Association with Intestinal Permeability in Calves Mono- or Co-Infected with Rotavirus

Özet: Köpeklerde atopik dermatit (cAD), başlıca belirti olarak pruritus (kaşıntı) ile seyreden kronik bir inflamatuvar deri hastalığıdır. Geleneksel tedavi yöntemleri arasında topikal ve sistemik ajanların yanı sıra alerjene özgü immünoterapi (ASIT) yer almaktadır; ancak bu yöntemlerin etkinliği değişkenlik göstermekte ve olası yan etkileri nedeniyle alternatif tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Metilen mavisi (MB), antimikrobiyal ve nöromodülatör etkileri bulunan katyonik bir fotosensitizer olup, insan tıbbında periferik sinir uçlarını bloke ederek pruritusun hafifletilmesinde olumlu sonuçlar göstermiştir. Bu çalışmanın amacı, nebulizasyon yoluyla uygulanan MB'nin atopik dermatitli köpeklerde kaşıntı şiddetini azaltmadaki tedavi edici potansiyelini değerlendirmektir. Bu amaçla, en az üç haftadır herhangi bir tedavi almamış ve atopik dermatit tanısı konmuş toplam 13 köpek çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm olgular, Köpek Atopik Dermatiti Yaygınlık ve Şiddet İndeksi (CADESI-04) ve Görsel Analog Skala (VAS) kullanılarak değerlendirilmiştir. MB, tek seanslık bir nebulizasyon uygulamasıyla verilmiş ve pruritus skorları 2., 4., 6., 8. ve 10. günlerde kaydedilmiştir. Elde edilen veriler, MB uygulamasını takiben kaşıntı skorlarında belirgin bir azalma olduğunu göstermiştir; en dikkat çekici iyileşmeler ise 4., 6. ve 8. günlerde gözlenmiştir. Çalışma süresince herhangi bir yan etkiye rastlanmamıştır. Nöromodülatör ve antiinflamatuvar özellikleri göz önünde bulundurulduğunda, MB, atopik dermatitle ilişkili pruritusun kontrolünde umut vadeden bir alternatif tedavi seçeneği olarak öne çıkmaktadır. Sonuç olarak, nebulize MB uygulaması, cAD olgularında pruritusun yönetiminde güvenli ve etkili bir yöntemdir. Bu bulgular, veteriner dermatoloji alanında MB'nin etki mekanizmalarının ve uzun vadeli tedavi potansiyelinin daha kapsamlı şekilde araştırılmasını gerektirmektedir.

Anahtar Kelimeler: Calf, Diarrhea, Intestinal Permeability, Rotavirus, Zonulin

1. Introduction

Canine atopic dermatitis (cAD) is a chronic inflammatory skin disorder with a predominance of pruritus (itching) that develops as a result of the interaction of genetic predisposition and environmental allergens. Pollen, molds, house dust mites, dietary components and secondary

infections can increase the severity of the disease (1). In cAD, which has no curative treatment, it is recommended to manage on an individual patient basis and to determine sustainable treatment strategies in the long term. Topical and systemic agents are widely used in the treatment of cAD (1). Systemic agents include cyclosporine, oclacitinib and lokivetmab, which act by suppressing inflammation and

mediators of pruritus (2). Allergen-specific immunotherapy is considered as a technique that supports the development of long-term immunotolerance in dogs with cAD (3).

Alternative therapeutic approaches include mesenchymal stem cell (MSC) applications, mast cell inhibitor masitinib, and agents such as luteolin that reduce the expression of proinflammatory cytokines (4). In addition, lactoferricin/verbascoside compounds prevent secondary infections, and vaccines against IL-31 are effective in controlling pruritus (5,6). Cannabidiol and its derivatives alleviate pruritus by acting through the endocannabinoid system, although probiotics may play a supportive function in the management of clinical signs with their immunomodulatory properties (7). Nutritional supplements such as vitamin D and E show anti-inflammatory effects, while agents such as pentoxifylline and misoprostol might improve symptoms by suppressing TNF- α and inflammatory cytokines (8,9).

Methylene blue (MB) is a cationic dye which could be stimulated by red light in photodynamic applications, generating reactive oxygen species in presence of molecular oxygen (10). However, beyond aforementioned usage area, MB has therapeutic potential in various medical applications due to its antimicrobial, antioxidant, and neuromodulatory properties. In veterinary medicine, MB has been reported to be effective against a broad spectrum of microorganisms, especially in treatment of superficial infections (10). Its ability to inactivate spores and hyphae of dermatophyte agents makes MB a safe and economical option for the management of skin infections (11). Another importance of MB in the biomedical field is management of pruritus. In medicine, pruritus ani is another important symptom following hematochezia in anorectal diseases and its pathogenesis is explained by “itch-scratch-itch” term (12). The constant stimulation of sensory nerves causes patients to exhibit repetitive behaviors that increase pruritus and cause damage to skin barrier (13). Studies medicine have shown that MB reduces pruritus by blocking the nerve endings of unmyelinated C-fibers in the perianal region, that it has been suggested on MB injections might be an effective method in the management on treatment-resistant idiopathic pruritus ani (13,14).

In veterinary medicine, effective management of pruritus in cAD is of great importance to improve the life quality. In this context, the aim of this study to evaluate the Visual Analog Score (VAS) outcomes of using methylene blue in the management of pruritus in dogs with atopic dermatitis.

2. Materials and Methods

2.1. Research era / Triage criteria

The present study was conducted at the Aydin Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine,

Department of Internal Medicine. In a total of 13 dogs (n=5 female, eight male, at the age of 2 to 9 years, three crossbred and 10 pure breeds) were enrolled, with primary inclusion criteria as pruritus were tentatively diagnosed with a presumed cAD based on through history, clinical signs, dermatoscopy (DermLite, DL4 Dermatoscopy), epidermal corneometry (Callegari Soft Plus, Italy), Polychex in vitro Allergy Test (Germany), Quantum Pet Bioresonance Assay (China) and relevantly dermatological interpretation, similar to previous studies by the same researchers (15-19). All dogs participated based on written owner consent and available ethical guidelines (Aydın Adnan Menderes University, Animal Experiments Local Research Committee (ADU-HADYEK document no: 2017/008). During the trial, all dogs were subjected to low glycemic index commercial food. As an inclusion criterion, none of the dogs were allowed to receive any drug for at least 3 3-week duration. An entire physical analysis was performed on days 0 and 10. The Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index version 4 (CADESI-04) was performed and fulfilled in an attempt to follow the clinical findings. Although the CADESI-04 was used to support the clinical diagnosis of cAD and determine baseline status, it was not used as a primary outcome measure in this study. Pet owners were instructed to systematically evaluate and document pruritus severity utilizing a 10 cm Visual Analog Scale (VAS), following standardized assessment protocols described in the literature. (20-21).

2.2. Methylene blue application

Aropi Methylene Blue Solution 1%, 50 ml (Aropi Chemistry, formula: C₁₆H₁₈ClN₃S, molarity mass: 319,85 g/mol) was preferred and prescribed by the present investigators, in which animal owners were easily purchased from available online stores. Briefly a single dose of MB was administered by inhalation at 2 mg/kg. The total dose was diluted in lactated ringer solution of 5 ml was added on to carrier chamber of nebulization device (Mesilife Br-cn116 Compressor Nebulization Device Cn116) which were was then by usage of air mask the dogs were inhaled/nebulized. Every dog participated received this MB solution by inhaler route for 1 session solely. There was no side effect noticed.

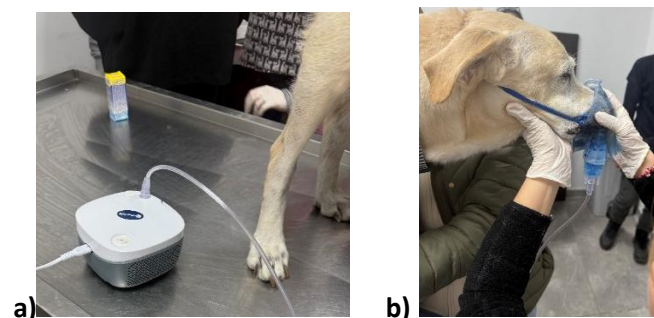


Figure 1. a. Mesilife Br-cn116 Compressor Nebulization Device Cn116, MB solution as shown on the table and b) inhaled MB by use of airway mask.

2.3. Statistical analyses

All statistical analyses were conducted using SPSS 29.0 (IBM, USA). Descriptive statistics, including mean, median, standard dev, and interquartile ranges, were calculated for each time point to summarize the distribution of VAS (Visual Analog Scale) values across different days. To assess differences in VAS values over time, the Friedman test, was applied to define the statistically significant alterations on repeated measurements. Pairwise comparisons between baseline (Day 0) and subsequent days (Days 1, 2, 3, 4, and 5) were performed using the Wilcoxon signed-rank test to identify specific time points. A significance level of $p < 0.05$ was considered statistically significant for all analyses.

3. Results

The results of the descriptive statistics performed to evaluate the change in VAS scores between days were presented in a table. Friedman analysis was performed to determine the statistical difference between days. According to the results of Friedman analysis, VAS scores showed a statistically significant difference between days ($p < 0.001$). To evaluate the difference between days in detail, pairwise comparisons between day 0 and the following days were analyzed with Wilcoxon paired rank test. As a result of these comparisons, a statistically significant difference was found between day 0 and all other days ($p < 0.05$). Especially the p-values obtained on days 4, 6 and 8 were at the $p < 0.001$ level (Table 1).

Table 1 ^{a,b}. Values with different letters in the same column indicate statistical differences between day 0 and other days.

Days	Mean	Std	Median	Minumum	Maximum
Day 0	8.43 ^a	1.28	8.0	6.0	10.0
Day 2	7.29 ^b	1.44	7.0	5.0	10.0
Day 4	5.64 ^b	1.87	6.0	2.0	8.0
Day 6	3.71 ^b	1.68	3.5	0.0	6.0
Day 8	2.14 ^b	1.29	2.0	0.0	5.0
Day 10	1.07 ^b	1.07	1.0	0.0	3.0

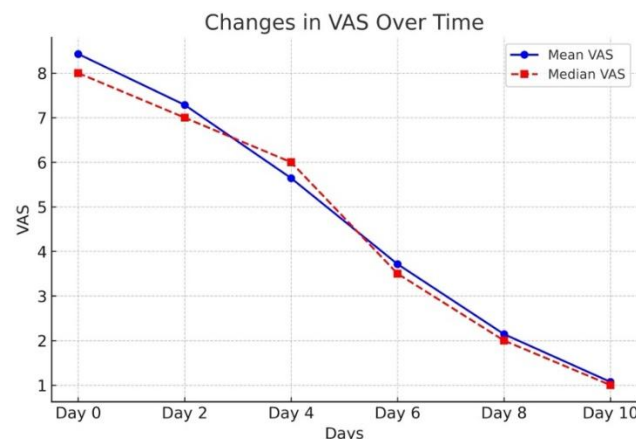


Figure 2. Alterations among VAS pruritus scores to those of dogs with cAD linked to trial days.

4. Discussion and Conclusion

In this study, inhaled MB significantly ($p < 0.001$) reduced pruritus scores associated with atopic dermatitis. The findings support that MB may be an effective agent in the management of pruritus. In the literature, it has been reported that MB has been used in various medical conditions with different application routes and successful results have been obtained (22,23). For example, it was reported that MB was successfully used in a dog with dermatophytosis by topical photodynamic therapy and the lesions healed in a short time (24). Prolonged administration of antifungal agents has been associated with significant adverse effects, including hepatotoxicity. Therefore, MB may serve as a safer alternative to mitigate the risk of systemic toxicity (22). In the present study during nebulization with MB, there was no side effects noticed.

In our study, inhaled administration of MB provided a statistically significant decrease in pruritus scores. Significant decreases in pruritus scores, especially on days 4, 6 and 8, were found to be remarkable in terms of the early efficacy of MB. These data suggest that MB may be considered as an alternative strategy in the management of cAD. Moreover, this novel treatment modality could substitute old and unfashioned drug trials.

The effects of MB on pruritus have historically been associated with its ability to stain nerve terminals and disrupt their function. Ehrlich's discovery in 1890 that high concentrations of MB target nerve terminals and disrupt their function with local application paved the way for the use of this compound in the treatment of neurological diseases and rheumatic conditions (25,26). In the present study MB was preferred to be given in inhaler route which could have hastened clinical recovery among dogs enrolled.

In a study conducted in 1968, MB was shown to be effective in the treatment of refractory idiopathic pruritus ani. In clinical and electron microscopic examinations, it was

determined that MB injection caused local nerve terminal necrosis and this effect blocked sensory transmission for approximately 26-28 days (27). This mechanism reduces the symptoms by breaking the itch-scratch-itch cycle, which is one of the most important triggers of pruritus. In addition, it has been reported that MB causes a reversible change in nerve tissue and does not cause any disruption in normal tissue structure in long-term follow-up (28). Although histopathological assessment could not be performed in this study, the absence of adverse reactions and observed clinical improvement suggests that MB might utilize its effects without harmful impact on tissue integrity. These data were in accordance with our results obtained herein. Vicious itching cycle was disrupted solely with MB inhalation in the present study. This was supported by the results we obtained.

In our study, MB administered by inhalation was found to be effective in reducing pruritus due to atopic dermatitis. In the literature, it has been reported that MB reduces itching in the perianal region by creating local nerve blockage when administered by injection (28,29). Consistent with previous findings, this study demonstrated that inhaled MB administration effectively alleviated pruritus associated with cAD. Considering the neuromodulatory effects of MB, it is thought that this compound may reduce itching sensation by suppressing the neuroinflammatory processes underlying pruritus. The regulatory effects of methylene blue on inflammatory processes and ROS have been investigated in different clinical situations. In the literature, it has been reported that MB suppresses inflammation by inhibiting cytokine production (30). In studies in COVID-19 patients, inhaled MB has been shown to reduce inflammatory markers and decrease oxygen demand (31). In the referenced study, a notable reduction in inflammatory markers, including C-reactive protein (CRP) and lactate dehydrogenase (LDH), was observed in groups receiving inhaled MB treatment.

Atopic dermatitis is a disease associated with high levels of proinflammatory cytokines (IL-4, IL-13, IL-31) and Th2 response and is recognized as one of the main causes of chronic pruritus. In the literature, it has been reported that MB suppresses inflammation by providing large-scale cytokine inhibition (30). MB has also been suggested to contribute to the regulation of inflammatory processes by modulating nitric oxide (NO) production (32). It has been suggested that NO metabolites are at high levels in COVID-19 patients and MB may regulate these mechanisms with its antioxidant effects (33). Regarding skin survival among burn models of rats, MB diminished necrosis, in association with lowered oxidative stress via NO blockage (34). Although we did not measure NO levels compared to those of dogs enrolled in this study, we could speculate that MB was capable of inhibiting NO levels at least at the skin anatomy. As a well-known neurotransmitter, NO has been linked as a pruritus mediator (35), contributing to its etiology. Keratinocytes, fibroblasts, and mast cells are whole selected examples of skin cells that could emit NO (36). All aforementioned explanations might be responsible for the clinical recovery obtained at the present study herein reported, in which MB was probably capable of suppressing NO levels among the cutaneous environment of dogs with atopic dermatitis.

8. Klinger, C. J., Hobi, S., Johansen, C., Koch, H. J., Weber, K, et al. Vitamin D shows in vivo efficacy in a placebo-

(35), contributing to its etiology. Keratinocytes, fibroblasts, and mast cells are whole selected examples of skin cells that could emit NO (36). All aforementioned explanations might be responsible for the clinical recovery obtained at the present study herein reported, in which MB was probably capable of suppressing NO levels among the cutaneous environment of dogs with atopic dermatitis.

In Conclusion, VAS scores exhibited a statistically significant difference between days ($p < 0.001$) (table 1 and figure 2). To evaluate the difference between days in detail, pairwise comparisons between day 0 and the following days were analyzed with Wilcoxon paired rank test. As a result of these comparisons, a statistically significant difference was found between day 0 and all other days ($p < 0.05$). Especially, the p-values obtained on days 4, 6, and 8 were at the $p < 0.001$ level (Table 1). Mean and median Vas pruritus scores on day 0 vs. day 10 were 8.43 vs 8 and 1.07 vs 1.0, indicating the efficacy of MB as a therapeutic response against pruritus in dogs with atopic dermatitis.

Authors' contributions

All authors contributed equally and were involved at all stages of the manuscript.

Competing interests

There is no conflict of interest between the authors.

References

1. Olivry, T., DeBoer, D. J., Favrot, C., Jackson, H. A., Mueller, R. et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Vet Res.* 2015; 11: 210.
 2. Gonzales, A. J., Bowman, J. W., Fici, G. J., Zhang, M., Mann, D, et al. Oclacitinib (APOQUEL®) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. *J Vet Pharmacol Ther.* 2014; 37(4): 317–324.
 3. Mueller R. Allergen-specific immunotherapy. In: Noli C, Foster A, Rosenkrantz W, eds. *Veterinary Allergy*. Oxford: John Wiley & Sons; 2014: 85–89.
 4. Kaur, G., Ramirez, A., Xie, C., Clark, D., Dong, C., Maki, C. et al. A double-blinded placebo-controlled evaluation of adipose-derived mesenchymal stem cells in treatment of canine atopic dermatitis. *Vet Res Commun.* 2022; 46(1): 251–260.
 5. Bachmann, M. F., Zeltins, A., Kalnins, G., Balke, I., Fischer, N, et al. Vaccination against IL-31 for the treatment of atopic dermatitis in dogs. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 142(1): 279–281.
 6. Biasibetti E, Bruni N, Bigliati M, Capucchio MT. Lactoferricin/verbascoside topical emulsion: A possible alternative treatment for atopic dermatitis in dogs. *Nat Prod Res.* 2018; 32(17): 2107–2110.
 7. Loewinger, M., Wakshlag, J. J., Bowden, D., Peters-Kennedy, J., & Rosenberg, A. The effect of a mixed cannabidiol and cannabidiolic acid-based oil on client-owned dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2022; 33(4): 329–e77.
- controlled, double-blinded, randomised clinical trial on canine atopic dermatitis. *Vet Rec.* 2018; 182(14): 406–406.

9. Saridomichelakis MN, Olivry T. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet J*. 2016; 207: 29–37.
10. Sellera FP, Nascimento CL, Ribeiro MS. Photodynamic therapy in veterinary medicine: From basics to clinical practice. In: Sellera FP, Nascimento CL, Ribeiro MS, eds. Cham: Springer; 2016: 169–196.
11. Li C, Jia X, Bian Y, Qi D, Wu J. Different susceptibility of spores and hyphae of *Trichophyton rubrum* to methylene blue mediated photodynamic treatment in vitro. *Mycoses*. 2021; 64(1): 48–54. <https://doi.org/10.1111/myc.13182>
12. Abramowitz L, Benabderrahmane M, Pospait D, Philip J, Laouénan C. The prevalence of proctological symptoms amongst patients who see general practitioners in France. *Eur J Gen Pract*. 2014; 20(4): 301–306.
13. Hsieh, J. C., Hagermark, O., Stahle-Backdahl, M., Ericson, K., Eriksson, L, et al. Urge to scratch represented in the human cerebral cortex during itch. *J Neurophysiol*. 1994; 72(6): 3004–3008.
14. Etter L, Myers SA. Pruritus in systemic disease: Mechanisms and management. *Dermatol Clin*. 2002; 20(3): 459–472.
15. Ural, K., Gültekin, M., Erdoğan, H., Erdoğan, S., Gül, G, et al. Could short-term altered calendar probiotic treatment relieve itching in dogs with atopic dermatitis? *Türk Klin J Vet Sci*. 2020; 11: 1–8. <https://doi.org/10.5336/vetsci.2019-71390>
16. Ural K. Fecal microbiota transplantation capsule therapy via oral route for combatting atopic dermatitis in dogs. *Ankara Univ Vet Fak Derg*. 2022; 69(2): 211–219. <https://doi.org/10.33988/auvfd.822971>
17. Ural, K., Erdoğan, H., Erdoğan, S., Camkerten, İ., & Şahin, N. Circulating serum zonulin levels before and after probiotic enema treatment in dogs with atopic dermatitis: Randomized clinical study. *Türk Klin J Vet Sci*. 2021; 12(2): 70–78.
18. Ural, K., Erdoğan, S., Erdoğan, H., Gültekin, M., Gül, G., et al. Köpeklerde Atopinin İyi, Kötü ve Çirkin Yönleri: Çoklu Olgu Serisi ile Retrospektif Çalışma. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 2020, 11(1).
19. Ural K, Gültekin M, Erdoğan S, Erdoğan H. Antipruritic armamentarium with short term nutritional support solution involving silymarin and curcumin for atopic dermatitis in dogs. *MAE Vet Fak Derg*. 2021; 6(1): 1–7.
20. Cosgrove SB, Wren JA, Cleaver DM, et al. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the Janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel®) in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol*. 2013; 24: 587–597.
21. Hill PB, Lau P, Rybnicek J. Development of an owner-assessed scale to measure the severity of pruritus in dogs. *Vet Dermatol*. 2007;18:301-308.
22. Moriello K, Coyner K, Paterson S, Mignon B. Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats: Clinical consensus guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Vet Dermatol*. 2017;28(4):266–e68. <https://doi.org/10.1111/vde.12440>
23. Paryuni A, Indarjulianto S, SW S. Dermatophytosis in companion animals: A review. *Vet World*. 2020;13(6):1174–1181. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1174-1181>
24. Cabral FV, Sellera FP, Ribeiro MS. Methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy for canine dermatophytosis caused by *Microsporum canis*: A successful case report with 6 months follow-up. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021;36:102602.
25. Oz M, Lorke DE, Hasan M, Petroianu GA. Cellular and molecular actions of methylene blue in the nervous system. *Med Res Rev*. 2011;31(1):93–117.
26. Wainwright M, Crossley KB. Methylene blue: cA therapeutic dye for all seasons? *J Chemother*. 2002;14(5):431–443.
27. An R. Atlas of the operations on the rectum and colon. Moscow Meduch Posovie; 1968.
28. Eusebio EB, Graham J, Mody N. Treatment of intractable pruritus ani. *Dis Colon Rectum*. 1990;33(9):770–772.
29. Kim JH, Kim DH, Lee YP. Long-term follow-up of intradermal injection of methylene blue for intractable, idiopathic pruritus ani. *Tech Coloproctol*. 2019;23(2):143–149.
30. Scigliano G, Scigliano GA. Methylene blue in COVID-19. *Med Hypotheses*. 2021;146:110455. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110455>
31. Patidar V, Sharma A, Bhorkar S, Tripathi AP, Dhaneriya S. The role of nebulized methylene blue (NMB) in the management of COVID-19 cases: An observational study. *Int J Med Arts*. 2022;4(2):2129–2132.
32. Alamdari DH, Moghaddam AB, Amini S, Keramati MR, Zarmehri AM, et al. Application of methylene blue-vitamin C-N-acetyl cysteine for treatment of critically ill COVID-19 patients: Report of a phase-I clinical trial. *Eur J Pharmacol*. 2020;885:173494. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173494>
33. Evora PR. Methylene blue is a guanylate cyclase inhibitor that does not interfere with nitric oxide synthesis. *Tex Heart Inst J*. 2016;43(1):103. <https://doi.org/10.14503/THIJ15-5629>
34. Rosique MJ, Rosique RG, Faria FM, Oliveira CC, Farina JA, et al. Methylene blue reduces progression of burn and increases skin survival in an experimental rat model. *Burns*. 2017;43(7):1702–1708.
35. Ostadhadi S, Haj-Mirzaian A, Azimi E, Mansouri P, Dehpour AJ. Involvement of nitric oxide in serotonin-induced scratching in mice. *Clin Exp Dermatol*. 2015;40(6):647–652.
36. Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: The skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Mol Pathol Biol*. 2006;86(4):1309–1379.



Köpeklerde Fukosidozis: Güncel Tedavi Yöntemleri ve Araştırma Perspektifleri

Hasan ERDOĞAN ¹✉, İlayda TENDAR ¹, Tahir ÖZALP ¹, Songül ERDOĞAN ¹, Kerem URAL ¹

¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın/Türkiye

◆ Geliş Tarihi/Received: 21.01.2025

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 04.02.2025

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2025

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Erdoğan H, Tendar İ, Özalp T, Erdoğan S, Ural K. Köpeklerde Fukosidozis: Güncel Tedavi Yöntemleri ve Araştırma Perspektifleri. Bozok Vet Sci (2025) 6, (1):46-52.

Özet: Köpeklerde fukosidozis, lizozomal depo hastalıkları grubunda yer alan ve α -L-fukosidaz enzim eksikliği nedeniyle ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Otozomal resesif olarak kalıtılan bu hastalık, progresif nörolojik semptomlar, visceral organ lezyonları ve dokularda glikolipid ile glikoprotein birikimi ile karakterizedir. Klinik olarak, koordinasyon kaybı, davranış değişiklikleri, nöbetler, körlük, kas zayıflığı ve ilerleyici nörolojik disfonksiyon gibi belirtiler gözlemlenir. Fukosidozisli köpeklerde semptomlar genellikle genç yaşta başlar ve erken dönemde tedavi edilmezse hastalık ilerleyerek ölümlle sonuçlanabilir. Tedavi yöntemleri arasında hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HCT) öne çıkmaktadır. Bu yöntem, sinir sisteminde α -L-fukosidaz aktivitesini artırarak nöropatolojik lezyonları iyileştirmiş ve klinik semptomları hafifletmiştir. Özellikle erken teşhis edilen vakalarda, HCT'nin köpeklerde yaşam kalitesini artırdığı ve hastalığın ilerleyişini yavaşlattığı bildirilmiştir. Enzim replasman tedavisi (ERT) de umut vaat eden bir yaklaşım olmakla birlikte, bu yöntemin etkinliği sınırlıdır ve substrat birikiminin tamamen giderilmesi henüz mümkün olmamıştır. Köpeklerde fukosidozis üzerine yapılan araştırmalar hem hastalığın patofizyolojisini anlamak hem de insan ve hayvanlarda tedavi stratejileri geliştirmek için kritik bir model sunmaktadır. Ancak, tedavide kan-beyin bariyerini aşabilecek yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerekliliği devam etmektedir. Gen tedavisi gibi yenilikçi yaklaşımlar, bu alandaki çalışmalar için büyük bir potansiyele sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Fukosidoz, Köpek, Lizozomal depo hastalıkları, Sinir sistemi

Fucosidosis in Dogs: Current Treatment Approaches and Research Perspectives

Abstract: Fucosidosis in dogs is a genetic disorder classified under lysosomal storage diseases, caused by a deficiency of the enzyme α -L-fucosidase. This autosomal recessive condition is characterized by progressive neurological symptoms, visceral organ lesions, and the accumulation of glycolipids and glycoproteins in tissues. Clinically, affected dogs exhibit signs such as loss of coordination, behavioural changes, seizures, blindness, muscle weakness, and progressive neurological dysfunction. Symptoms typically manifest at a young age, and without early intervention, the disease progresses and often leads to death. Among treatment options, hematopoietic stem cell transplantation (HCT) stands out. This approach has been shown to increase α -L-fucosidase activity in the nervous system, ameliorate neuropathological lesions, and alleviate clinical symptoms. Particularly in cases diagnosed early, HCT has been reported to improve the quality of life and slow the progression of the disease in dogs. Enzyme replacement therapy (ERT) also represents a promising strategy, though its effectiveness remains limited, and complete resolution of substrate accumulation has not yet been achieved. Research on canine fucosidosis provides a critical model for understanding the pathophysiology of the disease and developing therapeutic strategies for both humans and animals. However, there remains a pressing need to develop novel methods capable of crossing the blood-brain barrier for more effective treatments. Innovative approaches, such as gene therapy, hold significant potential for advancing the field and improving outcomes for affected individuals.

Keywords: Fucosidosis, Dog, Lysosomal Storage Diseases, Nervous System

1. Giriş

Fukosidozis, lizozomal depo hastalıkları (LSD'ler) arasında sınıflandırılan nadir bir genetik bozukluktur ve hem insanlarda hem de hayvanlarda benzer patolojik süreçlerle karakterizedir. Lizozomal α -L-fukosidaz enziminin eksikliğinden kaynaklanan bu durum, FUCA1 genindeki mutasyonlar nedeniyle oluşur ve lizozomlarda fukoz içeren oligosakkaritlerin ve glikolipidlerin patolojik olarak birikmesine neden olur (1,2). Fukosidozis, bu enzim eksikliği ve ilgili şekerlerin depolanmasıyla tanımlanır ve otozomal resesif bir şekilde kalıtılır (3). Bu hastalık, özellikle merkezi

sinir sistemi (CNS) olmak üzere birçok organ sistemini etkiler ve bilişsel ve motor fonksiyonlarda hızlı bozulmalara yol açar. Lizozomlarda glikokonjugatların birikmesi, substrat bağlama özelliklerini ve enzim stabilitesini bozarak hidrolaz aktivitesini engeller. Sonuç olarak, α -L-fukoz bağlantılı glikokonjugatların monomerlere parçalanması engellenir, bu da lizozomal disfonksiyona, hücrel nekroz ve apoptoza neden olur (4,5). İngiliz Springer Spaniel köpeklerindeki fukosidozis, bu hastalığın insanlardaki formuna yönelik terapötik denemelerde kullanılabilecek tek hayvan modelini temsil etmektedir (3). Bu köpeklerdeki hastalık, FUCA1 geninde meydana gelen 14 baz çiftlik bir kayma mutasyonu

sonucu ortaya çıkar ve lizozomal genişleme, nöroenflamasyon, hipomiyelinasyon ve aksonal distrofiler ile karakterizedir. Bu patolojik değişiklikler, yaşamın ilk ayında ortaya çıkar ve klinik belirtilerden çok önce başlar (6). Fukosidozisli köpeklerde nörolojik disfonksiyon belirtileri genellikle motor, davranışsal ve duyuşal fonksiyonlardaki bozulmalara dayanarak değerlendirilir. Standart nörolojik muayeneler, sağlıklı işlevden sapmaları belirlemede en sık kullanılan yöntemlerdir. Ancak, klinik belirtileri niceliksel olarak değerlendiren standart skorlama sistemleri hem köpeklerde hem de insanlarda henüz yeterince geliştirilememiştir (7,8). İngiliz Springer Spaniel köpeklerinde yapılan çalışmalarda, motor, davranışsal ve duyuşal disfonksiyonu değerlendirmek amacıyla bir "nörolojik disfonksiyon skoru" (NDS) geliştirilmiştir. Bu skor, hastalığın ilerleyişi sırasında nörolojik belirtilerin belirginleştiği eşiği tespit etmek ve hastalık seyrini daha iyi anlamak için istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (9,10). Lizozomal depo hastalıklarının hayvan modelleri, nörolojik ve patolojik değişimlerin durdurulması ya da geciktirilmesi için kritik bilgiler sağlar. Fukosidozis gibi hastalıkların patolojik süreçlerini anlamak, hem insanlarda hem de hayvanlarda terapötik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sunacaktır.

Bu derleme, fukosidozisin biyokimyasal, moleküler ve terapötik yönlerini inceleyerek, hastalığın veterinerlik ve insan tıbbı üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi hedeflemektedir. Özellikle köpek çalışmalarında hayvan modellerinden yararlanarak, bu nadir lizozomal depo hastalığına ilişkin kapsamlı bir genel bakış sunulmaktadır.

2. Etiyoloji

α -L-fukosidaz enzim eksikliğinden kaynaklanan köpek fukosidozisi, öncelikle Avustralya ve Birleşik Krallık'taki Springer Spaniel'lerde bildirilmiştir. Bu durumdan sorumlu mutant gen Avustralya'ya İngiltere'den ithal edilen İngiliz gösteri köpekleri aracılığıyla getirilmiştir. Başlangıçta, etkilenen Springer Spanieller yaşamın ilk yılında normal gelişim gösterir ve genellikle sağlıklı meslektaşlarından daha iyi performans göstererek onları arzu edilen gösteri adayları haline getirir (11).

1971 yılında Hartley ve ekibi bir İngiliz Springer Spaniel vakasını belgelemiştir. Daha sonraki 1978 ve 1980 raporlarında, ilerleyici nöropatolojik semptomları olan 2-3 yaşlarındaki iki Avustralya köpeği ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Genetik izleme, İngiltere'den ithal edilen bir köpekle yakın ailesel bağları ortaya çıkarmıştır. Hartley ve ark. 1982'de bu köpeklerde merkezi sinir sisteminde belirgin miyelin ve Purkinje hücre kaybı ile birlikte nöronlarda yaygın sitoplazmik vakuolizasyon gibi bulgular tanımlamıştır. Bazı vakuollerin oligosakkarit benzeri materyal içerdiği varsayılmıştır (9).

1983 yılına gelindiğinde, etkilenen bu köpeklerin yavrularında 12 ve 19 aylıkken klinik belirtiler ortaya çıkmıştır. Erken belirtiler arasında ön bacaklarda yürüme güçlüğü ve arka bacaklarda yükselme, ardından titreme, uyuşma ve yutma güçlüğü yer almaktadır. İlerleyen semptomlar körlük, sağırılık ve ilerleyici ataksiyi içerir ve etkilenen Springer Spanieller 3 ila 5 yaşları arasında uyuşuk bir halde ölür. İnsan fukosidozisine benzerliği nedeniyle köpek fukosidozisi, hastalığın incelenmesi için değerli bir hayvan modeli olarak hizmet eder. Araştırmalar, hematopoetik kök hücre nakli ve enzim replasman tedavilerini keşfetmek için bu modeli kullanmıştır (11).

Fukosidozis, insanlarda ilk olarak Durand ve ark. (1966) tarafından α -L-fukosidaz eksikliğinin neden olduğu nörovisseral bir depo hastalığı olarak tanımlanmıştır (12). Daha sonra Tsay ve ark. (1976) tarafından yapılan çalışmalarda depolanan oligosakkaritler karakterize edilmiştir (13). Lizozomal depo hastalıkları için çeşitli hayvan modelleri bildirilmiş olmasına rağmen (14), Hartley ve ark. (1982) tarafından yapılan çalışmaya kadar hayvanlarda fukosidozis vakası belgelenmemiştir (9). Springer Spaniellerde bir lizozomal depo hastalığı tanımlamışlar, insan fukosidozisi ile benzerliklere dikkat çekmişler ancak enzim defektini tanımlamamışlardır. Hartley ve ark. (1982) daha önceki bulgularıyla tutarlı hastalık özellikleri gösteren iki akraba Springer Spaniel yavrusunda α -L-fukosidaz eksikliğini doğrulamıştır (9).

3. Fukosidozisin Klinik Bulguları

Fukosidozis, α -L-fukosidaz eksikliği nedeniyle glikokonjugatların birikmesi sonucu beyin, karaciğer, kemik ve deri gibi dokularda anormal birikintilerin oluşmasına yol açan nörodejeneratif bir hastalıktır. Bu birikimler, zihinsel ve fiziksel işlevlerde ciddi bozulmalara neden olarak çeşitli klinik semptomların ortaya çıkmasına sebep olur. Fukosidozisin klinik bulguları, zihinsel ve motorik bozulmalar, büyüme geriliği, kaba yüz özellikleri, hepatosplenomegali, anjiyokeratomlar, telenjiektaziler, epilepsi, tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları, inguinal herni ve iskelet anomalilerini içerir. Bu semptomlar, diğer lizozomal depo hastalıklarında görülenlerle benzerlik gösterir (15). Fukosidozisli hastaların çoğu nörolojik bozulma veya solunum yolu enfeksiyonları nedeniyle erken yaşta kaybedilmektedir (2). Fukosidozis, ciddi nörolojik ve motor fonksiyon bozuklukları ile karakterizedir. Yaygın belirtiler arasında yürüme ve ayakta durma becerilerinin kaybı, sık düşmeler, oturma güçlükleri, dilde bozulma ve ayaklarda ekinovarus deformiteleri yer alır. Bazı hastalarda, hiperrefleksi ve fleksiyon kontraktürleriyle birlikte spastik kuadriparezi görülür. Daha nadir olarak, inkontinans, epileptik nöbetler ve östaki tüpü disfonksiyonuna bağlı olarak asimetrik hafif-orta derecede sensörinöral işitme kaybı rapor edilmiştir (2,16,17). Nörogörüntüleme sonuçları, beyaz maddede özellikle T1 ağırlıklı sekanslarda yüksek sinyal

yoğunluğu ve T2/FLAIR sekanslarında düşük sinyal yoğunluğu gösteren globus pallidusta belirgin anormallikler ortaya koyar ve bu bulgu, diğer nörometabolik bozukluklardan ayırt edici bir özellik taşıır (18,19,20).

Fukosidozisin ayırt edici bir özelliği, kaba bir yüz görünümünde olmasıdır. Bu görünüm genellikle hipertelorizm ve geniş bir burun köprüsü ile birlikte görülür. Ayrıca, büyüme geriliği yaygın olup boy ve kilo genellikle genç yaşta durur. Bu fiziksel özellikler, diğer lizozomal depo hastalıklarında gözlemlenenlere benzerlik gösterir (2,3,21). Fukosidozisteki solunum sistemi bulguları arasında tekrarlayan üst solunum yolu enfeksiyonları, pulmoner amfizem, uykuda solunum bozukluğu ve orta kulak iltihabı yer alır. Mukus viskoelastisitesinin etkilenmesi, bu semptomlara katkıda bulunan faktörlerden biridir. Ancak, fukosidoziste bağışıklık sistemi etkilenmediği için mukus temizliği genellikle solunum semptomlarını hafifletir, bu da kistik fibrozisten farklılık gösterir (2,22).

İskelet anomalileri, fukosidozisin yaygın bulgularındandır ve servikal platisspondiloz, deforme olmuş kaburgalar, skolyoz, lomber kifoz ve anormal odontoid süreçler gibi belirtileri içerir. Bu bulgular, disostozis multipleks olarak adlandırılır ve önemli tanısal özellikler taşıır (2). Dermatolojik bulgular arasında anjiyokeratomlar, özellikle alt karın veya genital bölgede görülen anjiyokeratom korporis diffusum yer alır. Anjiyokeratomlar genellikle kırmızı veya mor renkli, kabarık lezyonlar şeklinde olup, yaşla birlikte yaygınlaşır ve fukosidoziste tanı şüphesini artırır (23). Diğer deri anormallikleri arasında telenjektaziler, akrosiyanoz, kalınlaşmış deri, enine tırnak bantları ve ter üretiminde farklılıklar yer alır. Bu bulgular, glikolipidlerin ve glikoproteinlerin endotel hücrelerinde birikmesi sonucu ortaya çıkar, bu da kılcal damarların yenilenmesine yol açar (2). Fukosidozisin karaciğer ve dalakla ilgili bulguları arasında hepatosplenomegali yer alır. Hepatosplenomegali genellikle ilerleyici değildir ve histopatolojik incelemeler, karaciğerdeki balon benzeri hücrelerde seramid tetra ve pentaheksozidlerin biriktiğini gösterir (2,24,25). Oftalmolojik bulgular ise konjonktiva, retina ve deri damarlarında glikokonjugat depo materyali birikmesiyle ilgilidir. Ciddi görme bozukluğu nadir olmasına rağmen, konjonktiva hücrelerinde ve retinada vaküoler yapılar gözlemlenebilir (2). Fukosidoz, geri dönüşü olmayan şekilde ilerleyen bir nörodejeneratif bozukluktur. Klinik belirtiler, diğer lizozomal depo hastalıklarında gözlemlenen özelliklerle benzerlik göstermektedir. Hastaların %60'ında dermatolojik anormallikler, özellikle anjiyokeratomalar, rapor edilmiştir. Anjiyokeratomalar, özellikle on yıl ve daha uzun süre yaşayan hastalarda (%51) yaygındır, ancak patognomonik değildir (3). Fukosidozisli hastalarda genellikle erken dönemde nörolojik gerileme gözlemlenir ve hastaların çoğu 10 yaşından önce kaybedilir. 10 yaşından sonra, hastalar daha uzun süre hayatta kalabilmektedir (3). Bu hastaların %95'inde

zihinsel bozulma, %87'sinde motor bozulma ve %38'inde nöbetler gözlemlenmiştir (3). Erken nöropatolojik değişiklikler, Fuca1 eksikliği olan fare modellerinde nöroinflamasyon ve GM2 gangliosid birikimiyle ilişkilendirilmiştir (26).

3.1. Fukosidozisin Klinik Alt Tipleri

Fukosidozisin geleneksel olarak başlangıç ve ciddiyete göre iki tipe ayrılır. Bununla birlikte, klinik sunumlardaki değişkenlik, fukosidozisin farklı alt tiplerden ziyade bir spektrumu temsil ettiği görüşünü desteklemektedir (23,27). Tip I'de semptomlar yaşamın ilk altı ayı içinde ortaya çıkar ve hızlı nörolojik gerileme 5-10 yaşlarında ölüme yol açar. Tip II daha yavaş ilerler, semptomlar 2 yaşından önce başlar, ikinci on yıla ve bazen üçüncü on yıla kadar hayatta kalmaya izin verir. Tip II'de daha yaygın olan anjiyokeratomlar ayırt edici bir özellik olarak hizmet edebilir (23,27).

3.2. Epidemiyolojik Bulgular

Willems ve ark. (1991) tarafından 18 ülkeden 77 hastanın analiz edildiği bir derlemede, %95'inde zihinsel bozukluklar, %87'sinde motor işlev bozuklukları, %78'inde büyüme geriliği, %79'unda kaba yüz özellikleri, %58'inde disostoz multipleks, %78'inde tekrarlayan enfeksiyonlar, %52'sinde anjiyokeratomlar, %38'inde nöbetler ve %44'ünde organomegali bildirilmiştir (3). Wali ve ark. (2019) tarafından 75 hastayı kapsayan sonraki bir incelemede benzer klinik sıklıklar bulunmuş, ancak muhtemelen gelişmiş tedavi veya veri toplama yöntemleri nedeniyle farklılıklar kaydedilmiştir (28). Şanlı ve Uysal'ın (2022) tanımladığı Türk kohortlarında, tüm hastalarda yüksek oranda büyüme geriliği (%90), kaba yüz özellikleri (%100) ve tekrarlayan enfeksiyonlar (%63) ile birlikte zihinsel ve motor bozukluklar görülmüştür (21). Bu bulgular, Wali ve ark. (2019)'a kıyasla Willems ve ark. (1991) ile daha uyumludur ve popülasyonlar arasında klinik sunumlardaki değişkenliği vurgulamaktadır (3,28).

4. Tanı

İlk fukosidozis şüphesi genellikle klinik semptomlardan kaynaklanır, ancak diğer lizozomal depo hastalıkları ile örtüşmesi bu semptomları kesin tanı için yetersiz kılar. Globus pallidusta dalgalanan sinyal yoğunluğu ve hipomiyelinizasyon gibi nörogörüntüleme bulguları, fukosidozisin yüksek oranda göstergesidir ve tanısal şüpheyi artırır (29). Ek olarak, fukosidozisli hastalar idrarlarında aşırı glikopeptidler sergilerler. Biyokimyasal tanı tipik olarak serum ve plazmadaki enzim aktivitesinin ölçülmesini içerirken, kesin onay FUCA1 genindeki mutasyonların genetik analizi ile elde edilir (30). Hedeflenen FUCA1 testleri, farklı fenotiplere sahip bireyleri teşhis edebilir; ancak fukosidozisin geniş klinik spektrumu nedeniyle, kesin olmayan vakalar için kromozomal mikroyarray veya dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH) gibi daha

kapsamlı analizler önerilmektedir. Prenatal tanı büyük önem taşımaktadır. Fukosidozis otozomal resesif bir kalıtım modeli izlediğinden, mutasyon taşıyıcıları hala kısmi protein fonksiyonu ifade edebileceğinden, biyokimyasal testler prenatal tanı için yetersizdir. Bilinen bir FUCA1 patojenik varyantı olan aileler için, sonraki gebeliklerde prenatal genetik test veya preimplantasyon genetik test (PGT-M) önerilmektedir (2).

5. Sağaltım Seçenekleri

Hastalığın ilk kez 1966 yılında tanımlanmasından bu yana, kapsamlı araştırmalar klinik ve moleküler karakterizasyonuna odaklanmıştır. Bununla birlikte, nadir görülmesi ve birçok vakanın geç evrede teşhis edilmesi nedeniyle, tedavi yaklaşımlarındaki ilerleme yavaş olmuştur. Şu anda fukosidozis için kesin bir tedavi yoktur ve tedaviler semptomları hafifletmeyi ve yaşam kalitesini artırmayı amaçlamaktadır. Fizyoterapistler, ortopedistler, kardiyologlar, oftalmologlar ve nörologlar tarafından multidisipliner yönetim esastır (21). Erken mortalitenin önde gelen nedenleri olan nörolojik semptomlar ve tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları, hızlı ve etkili bir yönetim gerektirir. Üst solunum yollarında, anormal büyüyen dokulardan ortaya çıkan nazal polipler hava akışını engelleyerek burun tıkanıklığına, anosmiye ve uyku apnesine neden olabilir. Kendiliğinden düzelmeyen polipler için cerrahi olarak çıkarılması önerilir. Alt solunum yollarında albuterol, nebülize beklometazon ve flutikazon inhalerleri hava yolu şişmesini ve enflamasyonunu azaltabilir. Hava yolu temizleme sistemleri, mukusu küçük hava yollarından büyük hava yollarına mobilize etmek için kullanılır ve ateletazi ve pnömoni gibi komplikasyonları önler. Bir diğer önemli semptom olan nöbetler, anti-epileptik ilaçlarla yönetilir. Distoni için baklofen veya asetilkolin salınım inhibitörleri kullanılarak istemsiz kasılmalar geçici olarak hafifletilir (2).

5.1. Hematopoietik Hücre Transplantasyonu

Kemik iliği ve göbek kordonu kanı nakli de dahil olmak üzere hematopoietik hücre nakli, lizozomal depo hastalıkları için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntem, nakledilen bazı hücrelerin kan-beyin bariyerini geçmesini, mikroglialara farklılaşmasını ve lizozomal enzimler salgılamasını sağlar (31).

İnsan fukosidozisine benzeyen bir köpek fukosidozis modelinde yapılan çalışmalar, transplantasyonun kan-beyin bariyerinin arkasındaki nöral dokularda α -L-fukosidaz aktivitesini geri kazandırdığını göstermiştir. Köpeklerde yapılan çalışmalar, hematopoietik kök hücre transplantasyonunun (HCT) nakilden altı ay sonra sinir sisteminde α -L-fukosidaz aktivitesini normalin %10'undan fazlasına çıkardığını, nöropatolojik lezyonları iyileştirdiğini ve klinik belirtilerde ömür boyu süren önemli bir azalma sağladığını göstermiştir (10,32). Fukosidozlu yavrularda HCT, doğumdan hemen sonra teşhis edilmesi halinde bir

tedavi seçeneği olarak değerlendirilebilmektedir. Periferik sinir, visceral lezyonlar ve merkezi sinir sistemi patolojileri, tedavinin klinik semptomlar ortaya çıkmadan önce gerçekleşmesi koşuluyla iyileşme göstermiştir (10,32). İnsanlarda hematopoietik kök hücre nakli ilk olarak 1995 yılında, semptomatik bir kardeş nedeniyle MR taramasıyla tespit edilen 8 aylık bir erkek çocuğa uygulanmıştır. Nakil sonrası enzimatik aktivitesi artmış ve psikomotor gelişimi iyileşmiştir, ancak hafif nörogelişimsel gecikme devam etmiştir (33,34). Benzer şekilde, göbek kordonu kanı nakli, özellikle uygun kemik iliği donörü olmayan hastalarda enzim aktivitesini normalleştirmek ve nörolojik semptomları iyileştirmek için kullanılmıştır (35). Umut vaat etmesine rağmen, bu yöntem donör bulunabilirliği, erken tanı ihtiyacı ve immüno-supresyon ve enfeksiyon riskleri gibi nakil sonrası komplikasyonlar gibi zorluklarla karşı karşıyadır (36). Gen tedavisi potansiyel bir tamamlayıcı yaklaşım olarak görülmektedir, ancak hematopoietik kök hücre nakli fukosidozis hastalarında yaşam kalitesini iyileştirmek için klinik olarak uygulanabilir bir seçenek olmaya devam etmektedir (15,28).

5.2. Gen Terapisi

Gen terapisi, hematopoietik kök hücreleri eksik enzimi eksprese edecek şekilde genetik olarak modifiye ederek fukosidozisi tedavi etmek için başka bir yol sunar. Retroviral vektörler, etkinlikleri ve güvenlikleri nedeniyle bu çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (1). Bir çalışmada α -L-fukosidaz geni retroviral yapılar kullanılarak insan ve köpek fibroblastlarına başarıyla aktarılmış ve enzim eksiklikleri *in-vitro* olarak düzeltilmiştir. Bu retroviral sistemlerin hayvan modellerinde daha da geliştirilmesi, fukosidozis gen terapisi araştırmalarının ilerletilmesi için kritik öneme sahiptir (37). Gen terapisi, gelecekteki tedavi yöntemleri için umut verici bir araştırma alanı olarak kabul edilmektedir.

5.3. Enzim Replasman Tedavisi

Enzim replasman tedavisi (ERT), lizozomal depo hastalıklarında eksik enzim aktivitenin düzenli enzim infüzyonlarıyla geri kazanılmasını amaçlayan yaygın bir tedavi yaklaşımıdır. Başlangıçta Gaucher hastalığı için geliştirilen bu tedavi, Fabry ve Pompe hastalıkları gibi diğer lizozomal depo hastalıklarına da uygulanmıştır (38,39). Fukosidozis için yapılan klinik öncesi çalışmalarda, köpek modellerinde intrakisternal enzim infüzyonu kullanılarak α -L-fukosidazın doğrudan merkezi sinir sistemine verilmesi sağlanmıştır. Bu tedavi, CNS bölgeleri boyunca enzim dağılımını gösterirken, omurilik, beyin sapı, karaciğer, kemik iliği ve lenf düğümlerindeki oligosakkarit birikiminde önemli bir azalma sağlamıştır. Ayrıca, nöropatolojik iyileşmeler de gözlemlenmiş, tüm bu gelişmeler olumsuz bağışıklık tepkileri olmadan elde edilmiştir. Tedavi, tamamen iyileştirici olmamakla birlikte, erken müdahale ile etkinliğini göstermiştir ve tedaviye yönelik güvenlik kanıtları

sağlamıştır (2). Wolf ve ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, CHO-K1 hücrelerini kullanarak insan α -L-fukosidazını üretmiş ve bu tedaviyi nakavt farelerinde intravenöz olarak test etmiştir (40). Farelerde yapılan bu uygulamalar, enzimin viseral organlara etkili bir şekilde iletilmesini sağlamış ve terapötik kullanıma yönelik ön kanıt oluşturmuştur (41). Erken tanı ve düzenli tedavi uygulamalarıyla ERT, fukosidozis için umut verici bir tedavi seçeneği olarak ortaya çıkmıştır. 2015 yılında yapılan bir çalışmada köpeklerde uygulanan rekombinant α -L-fukosidaz enzimi tedavisi, fukosidozisle ilişkili nöropatolojik bulguları önemli ölçüde azaltmıştır (6). Bu tedavi, nöronal vakuolizasyon, astrositoz ve hipomiyelinasyon gibi merkezi sinir sistemi patolojilerinde belirgin iyileşme sağlamıştır. Ancak, Purkinje hücre kaybı ve bazı lezyonlardaki değişiklikler anlamlı olmamıştır. Bu bulgular, enzim replasman tedavisinin potansiyelini ortaya koyarken, hastalığın ilerlemesini durdurabilmek için daha kapsamlı biyokimyasal düzeltmelerin gerektiğini göstermektedir (6).

Fukosidoziste, enzim tedavisi, fukozid birikimini tersine çevirmede etkili olmuştur. *In vitro* ve *in vivo* yapılan araştırmalar, bu tedavi yaklaşımının, diğer lizozomal hastalıklar için elde edilen ERT bulgularına benzer şekilde başarılı olduğunu göstermektedir (42,43). Fukosidozisli köpeklerde kemik iliği nakli (BMT) sonrası plazma, lökositler ve viseral dokularda α -L-fukosidaz aktivitesinde hızlı ve sürdürülebilir bir artış gözlenmiş, sinirsel dokularda ise daha yavaş bir artış olmuştur. Sürekli enzim tedavisi, naklin ömrü boyunca stabil kalmış ve hastalık erken dönemde uygulandığında merkezi sinir sistemi patolojilerini iyileştirmiştir. BMT, klinik bulguların başlangıcını geciktirmiş (32) ve etkilenen çocukların yaşam kalitesini artırmıştır (34). Ancak, BMT tedavisi önemli mortalite oranlarıyla ilişkilidir ve her hastada uygun bir donör bulunamadığından, ek tedavi seçeneklerine duyulan ihtiyaç artmaktadır.

Cerebrospinal sıvı (CSF) aracılığıyla merkezi sinir sistemi için etkili ERT potansiyeli, köpekler, fareler ve mukopolisakkaridoz (MPS) hastalarında gösterilmiştir (44,45,46,47,48). MPS I mutan köpeklerinde kan-beyin bariyerini aşmak için intratekal ERT kullanılmış ve tedaviden 48 saat sonra beyin sıvısında yüksek enzim konsantrasyonları (normalin 23 katı) elde edilmiştir (49). CNS'deki glikozaminoglikan (GAG) birikiminin (normalin %57) azaldığı bulgular umut verici olsa da MPS I köpeklerinin daha önce rekombinant enzimle duyarlanmış olması, GAG birikiminin ve histolojik depolamanın dokularda etkilenmiş olabileceğini düşündürmektedir (49). MPS I köpeklerinde yapılan sık intratekal ve intravenöz infüzyonlar, beyin alt yapılarının normalleşmesini sağlamıştır (50). MPS IIIA farelerinde yapılan intratekal ERT, sinirsel dokularda eksik olan enzimi yerine koymuş ancak erken aksonal patolojiyi ortadan kaldıramamıştır (51). Yüksek doz intratekal ERT,

substrat birikimini doz bağımlı bir şekilde azaltmış ve nöropatolojide anlamlı bir azalma sağlamıştır (51). MPS IIIA köpeklerinde yapılan benzer bir tedavi, beyin yüzeyel ve derin bölgelerinde enzim dağılımını genişletmiş ve substrat birikiminde azalma sağlamıştır (52). Bu tedavi, bir MPS VI hastasında güvenli olarak kanıtlanmıştır ve şu anda MPS I (NCT00852358), MPS II (NCT00920647) ve MPS IIIA (NCT01155778) için intralumbal CSF ERT klinik denemeleri devam etmektedir (48). İntra-CSF enzim tedavisinin etkinliği, başka nörodejeneratif hastalıklarla yapılan çalışmalarla açıkça gösterilmiş olsa da her durumda etkili olacağı varsayılmamalıdır.

6. Sonuç

Köpeklerde fukosidozis, insan fukosidozisine benzer şekilde progresif nörolojik semptomlarla karakterize, nadir ancak önemli bir lizozomal depo hastalığıdır. Bu hastalık modelinde yapılan araştırmalar, hem hastalığın mekanizmalarının anlaşılmasına hem de potansiyel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine önemli katkılar sağlamıştır. Hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HCT) gibi tedavi yaklaşımlarının köpeklerde başarılı sonuçlar verdiği ve sinir sistemindeki α -L-fukosidaz aktivitesini artırarak nöropatolojik lezyonları iyileştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, bu tedavi yöntemi, erken teşhis edilen vakalarda klinik semptomların ilerlemesini önemli ölçüde yavaşlatmıştır. Köpek modellerinde yapılan çalışmalar, düşük doz ve düzenli enzim replasman tedavisinin (ERT) nörolojik semptomların hafifletilmesine katkı sağladığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, enzim aktivitesindeki artışa rağmen, substrat birikiminin tamamen giderilemediği ve nöropatolojik lezyonların tam onarımının henüz sağlanamadığı bilinmektedir. Bu durum, daha etkili ve uzun vadeli tedavi stratejilerine olan ihtiyacı vurgulamaktadır. Fukosidoz tedavisinde erken teşhis ve uygun donör bulunabilirliği, tedavi başarısı açısından kritik öneme sahiptir. Bunun yanı sıra, gen tedavisi ve spesifik nöroprotektif yaklaşımlar gibi yenilikçi yöntemler, köpeklerdeki deneysel çalışmalar sayesinde ilerleme kaydetmektedir. Bu araştırmalar, yalnızca köpekler için değil, aynı zamanda insan fukosidozisi tedavisi için de önemli bir model sunmaktadır.

Sonuç olarak, köpeklerde fukosidozis üzerine yapılan çalışmalar, hastalığın patofizyolojisini anlamaya ve mevcut tedavi yaklaşımlarını geliştirmeye yönelik değerli bilgiler sağlamıştır. Ancak, kan-beyin bariyerini aşan daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, bu alandaki en önemli gerekliliklerden biri olmaya devam etmektedir.

Kaynaklar

1. Occhiodoro T, Hopwood JJ, Phillip Morris C, Anson DS. Correction of α -L-Fucosidase Deficiency in Fucosidosis Fibroblasts by Retroviral Vector-Mediated Gene Transfer. *Hum Gene Ther*. 1992; 3(4):365-374.
2. Stepien KM, Ciara E, Jezela-Stanek A. Fucosidosis—Clinical Manifestation, Long-Term Outcomes, and Genetic Profile—Review and Case Series. *Genes (Basel)*. 2020; 11:1-13.
3. Willems PJ, Gatti R, Darby JK, Romeo G, Durand P, et al. Fucosidosis revisited: a review of 77 patients. *Am J Med Genet*. 1991;38:111-31.
4. Parc AL, Karav S, Bell JMLNDM, Frese SA, Liu Y, et al. Novel endo- β -N-acetylglucosaminidase releases specific N-glycans depending on different reaction conditions. *Biotechnol Prog*. 2015;31(4):891-900.
5. Pekdemir B, Karav S. Exploring the diverse biological significance and roles of fucosylated oligosaccharides. *Front Mol Biosci*. 2024;11:1403727.
6. Kondagari GS, Fletcher JL, Cruz R, Williamson P, Hopwood JJ, et al. The effects of intracisternal enzyme replacement versus sham treatment on central neuropathology in preclinical canine fucosidosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10:143.
7. Fletcher JL, Taylor RM. Associations between neurologic dysfunction and lesions in canine fucosidosis. *Genes Brain Behav*. 2016;15(4):420-28.
8. Fletcher JL, Kondagari GS, Vite CH, Williamson P, Taylor RM. Oligodendrocyte loss during the disease course in a canine model of the lysosomal storage disease fucosidosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2014;73(6):536-47.
9. Hartley WJ, Canfield PJ, Donnelly TM. A suspected new canine storage disease. *Acta Neuropathol*. 1982;56:323-30.
10. Taylor RM, Farrow BRH, Stewart GJ, Healy PJ, Tiver K. The clinical effects of lysosomal enzyme replacement by bone marrow transplantation after total lymphoid irradiation on neurologic disease in fucosidase deficient dogs. *Transplant Proc*. 1988;20:37-41.
11. Kelly WR, Clague AE, Barns RJ, Bate MJ, MacKay BM. Canine alpha-L-fucosidosis: a storage disease of Springer Spaniels. *Acta Neuropathol*. 1983;60(1-2):9-13.
12. Durand P, Borrone C, Della Cella G. A new mucopolysaccharide lipid storage disease? *Lancet*. 1966;288:1313-14.
13. Tsay GC, Dawson G, Sung SJ. Structure of the accumulating oligosaccharide in fucosidosis. *J Biol Chem*. 1976;251:5852-59.
14. Jolly RD, Hartley WJ. Storage diseases of domestic animals. *Aust Vet J*. 1977; 53:1-8.
15. Mao SJ, Zhao J, Shen Z, Zou CC. An unusual presentation of fucosidosis in a Chinese boy: a case report and literature review. *BMC Pediatr*. 2022;22:25.
16. Domin A, Zabek T, Kwiatkowska A, Szmatoła T, Deręgowska A, et al. The identification of a novel fucosidosis-associated FUCA1 mutation: a case of a 5-year-old Polish girl with two additional rare chromosomal aberrations and affected DNA methylation patterns. *Genes (Basel)*. 2021;12:35.
17. Jiang M, Liu S, Jiang H, Lin Y, Shao Y, et al. Brain abnormalities in fucosidosis: transplantation or supportive therapy? *Metab Brain Dis*. 2017;32:921-30.
18. Zubarioglu T, Kiykim E, Zeybek CA, Cansever MS, Benbir G, et al. Clinical and neuroradiological approach to fucosidosis in a child with atypical presentation. *Ann Indian Acad Neurol*. 2015;18:52-55.
19. Kaur A, Dhaliwal AS, Raynes H, Naidich TP, Kaufman DM. Diagnosis and supportive management of fucosidosis: a case report. *Cureus*. 2019;11:e6139.
20. BoAli A, Tlili-Graïess K, AlHashem A, Tabarki B. Neuroregression, coarse features, and oligosaccharides in urine. *Neurosciences*. 2017;22:325-30.
21. Şanlı ME, Uysal S. Fucosidosis: clinical and molecular findings of Turkish patients. *Turk J Pediatr*. 2022;64.
22. Rubin BK, Macleod PM, Sturgess J, King M. Recurrent respiratory infections in a child with fucosidosis: is the mucus too thin for effective transport? *Pediatr Pulmonol*. 1991;10.
23. Wang L, Yang M, Hong S, Tang T, Zhuang J, et al. Fucosidosis in a Chinese boy: a case report and literature review. *J Int Med Res*. 2020;48.
24. Terespolsky D, Clarke JT, Blaser SI. Evolution of the neuroimaging changes in fucosidosis type II. *J Inher Metab Dis*. 1996;19:775-81.
25. Ediz SS, Aralasmak A, Yılmaz TF, Toprak H, Yesil G, et al. MRI and MRS findings in fucosidosis: a rare lysosomal storage disease. *Brain Dev*. 2016;38:435-38.
26. Stroobants S, Wolf H, Callaerts-Vegh Z, Dierks T, Lübke T, et al. Sensorimotor and neurocognitive dysfunctions parallel early telencephalic neuropathology in fucosidosis mice. *Front Behav Neurosci*. 2018;12:69.
27. Gowda VK, Srinivasan VM, Vegda H, Bhat M. Fucosidosis with pathogenic variant in FUCA1 gene. *Indian J Pediatr*. 2020;87.
28. Wali G, Wali GM, Sue CM, Kumar KR. A novel homozygous mutation in the FUCA1 gene highlighting fucosidosis as a cause of dystonia: case report and literature review. *Neuropediatrics*. 2019;50.
29. Meena AK, Wander A, Manikandan S, Peer S, Bansal A. Magnetic resonance imaging pattern recognition in fucosidosis. *Indian J Pediatr*. 2024.
30. Wynne E, Wynne K, Cleary M, Brogan PA. Fucosidosis mimicking juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol Adv Pract*. 2018;2.
31. Massaro G, Geard AF, Liu W, et al. Gene therapy for lysosomal storage disorders: ongoing studies and clinical development. *Biomolecules*. 2021;11.
32. Taylor RM, Farrow BRH, Stewart GJ. Amelioration of clinical disease following bone marrow transplantation in fucosidase-deficient dogs. *Am J Med Genet*. 1992;42.
33. Miano M, Lanino E, Gatti R, et al. Four-year follow-up of a case of fucosidosis treated with unrelated donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27.
34. Vellodi A, Cragg H, Winchester B, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for fucosidosis. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15:153-58.
35. Jiang M, Liu S, Jiang H, et al. Brain abnormalities in fucosidosis: transplantation or supportive therapy? *Metab Brain Dis*. 2017;32:317-20.
36. Chakraborty S, Gupta AK, Gupta N, Meena JP, Seth R, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for storage disorders: present status. *Indian J Pediatr*. 2024;91:830-38.
37. Cavazzana M, Bushman FD, Miccio A, André-Schmutz I, Six E. Gene therapy targeting haematopoietic stem cells for inherited diseases: progress and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18.
38. Li M. Enzyme replacement therapy: a review and its role in treating lysosomal storage diseases. *Pediatr Ann*. 2018;47.
39. Desnick RJ. Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *J Inher Metab Dis*. 2004;27.

40. Wolf H, Damme M, Stroobants S, et al. A mouse model for fucosidosis recapitulates storage pathology and neurological features of the milder form of the human disease. *Dis Model Mech*. 2016;9:1015-28.
41. Wolf H. The lysosomal storage disease fucosidosis: towards enzyme replacement therapy [dissertation]. 2016.
42. Bielicki J, Muller V, Fuller M, Hopwood JJ, Anson DS. Recombinant canine α -L-fucosidase: expression, purification, and characterization. *Mol Genet Metab*. 2000;69(1):24-32.
43. Pomroy S. Canine fucosidosis experimental treatment by enzyme replacement therapy [thesis]. University of Sydney; 2002.
44. Auclair D, Finnie J, White J, Nielsen T, Fuller M, et al. Repeated intrathecal injections of recombinant human 4-sulphatase remove dural storage in mature mucopolysaccharidosis VI cats primed with a short-course tolerisation regimen. *Mol Genet Metab*. 2010;99(2):132-41.
45. Chang M, Cooper JD, Sleat DE, Cheng SH, Dodge JC, et al. Intraventricular enzyme replacement improves disease phenotypes in a mouse model of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Mol Ther*. 2008;16(4):649-56.
46. Dodge JC, Clarke J, Treleaven CM, Taksir TV, Griffiths DA, et al. Intracerebroventricular infusion of acid sphingomyelinase corrects CNS manifestations in a mouse model of Niemann–Pick A disease. *Exp Neurol*. 2009;215(2):349-57.
47. Lee WC, Tsoi YK, Troendle FJ, DeLucia MW, Ahmed Z, et al. Single-dose intracerebroventricular administration of galactocerebrosidase improves survival in a mouse model of globoid cell leukodystrophy. *FASEB J*. 2007;21(10):2520-7.
48. Muñoz-Rojas MV, Horovitz DDG, Jardim LB, Raymundo M, Llerena Júnior JC, et al. Intrathecal administration of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase to an MPS VI patient with pachymeningitis cervicalis. *Mol Genet Metab*. 2010;99(4):346-50.
49. Kakkis E, McEntee M, Vogler C, Le S, Levy B, et al. Intrathecal enzyme replacement therapy reduces lysosomal storage in the brain and meninges of the canine model of MPS I. *Mol Genet Metab*. 2004;83(1-2):163-74.
50. Dickson P, McEntee M, Vogler C, Le S, Levy B, et al. Intrathecal enzyme replacement therapy: successful treatment of brain disease via the cerebrospinal fluid. *Mol Genet Metab*. 2007;91(1):61-8.
51. Hemsley KM, Beard H, King BM, Hopwood JJ. Effect of high dose, repeated intra-cerebrospinal fluid injection of sulphamidase on neuropathology in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Genes Brain Behav*. 2008;7(7):740-53.
52. Hemsley KM, Norman EJ, Crawley AC, Auclair D, King B, et al. Effect of cisternal sulfamidase delivery in MPS IIIA Huntaway dogs—a proof of principle study. *Mol Genet Metab*. 2009;98(4):383-92.

BOZOK VETERİNER BİLİMLERİ (BOZOK VET BİL) YAZIM KURALLARI

AMAC

Bozok Veteriner Bilimleri'nde, Veteriner Klinik Bilimleri, Veteriner Klinik Öncesi Bilimleri, Veteriner Temel Bilimleri, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Zootečni ve Hayvan Besleme alanlarında hazırlanmış güncel ve özgün değeri olan orijinal araştırma makaleleri, olgu sunumları, derlemeler, kısa bildiriler ve editöre mektuplar yayımlanarak ulusal ve evrensel bilime katkı sağlamak amaçlanmıştır.

KAPSAM

Bozok Veteriner Bilimleri Yozgat Bozok Üniversitesinin bilimsel yayın organı olup Haziran ve Aralık aylarında olmak üzere yılda iki kez yayımlanır. Derginin kısaltılmış ismi 'Bozok Vet Sci'dir. Yayın hayatına 2020 yılından itibaren başlayacak olan Bozok Veteriner Bilimleri hakemli ve bilimsel süreli dergi olarak yayımlanacaktır.

Dergimizde, Türkçe ve İngilizce dillerinden birinde hazırlanmış olan ve daha önce başka bir dergiye eş zamanlı olarak sunulmamış Veteriner Klinik Bilimleri, Veteriner Klinik Öncesi Bilimleri, Veteriner Temel Bilimleri, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Zootečni ve Hayvan Besleme alanlarında hazırlanmış orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, davetli ve editör onayı alınmış derlemeler, kısa bildiriler ve editöre mektuplar yayımlanır.

YAZIM KURALLARI (MAKALENİN-YAZININ HAZIRLANMASI)

1. Yazıların sorumlulukları yazarlarına aittir. Gönderilen yazının yayımlanabilmesi için, yayın kurulunca tayin edilen danışmanlar tarafından uygun bulunması şarttır. Dergide yayımlanan yazılar için ücret ya da karşılık ödenmez. Kabul edilmeyen yazılar ve ekleri, aksi belirtilmediği takdirde iade edilmez.
2. Derginin yayın dili Türkçe ve İngilizce. Yayının başında, Türkçe "Özet", İngilizce "Abstract" kısımları yer almalıdır. Özet (Abstract) bölümü 200 kelimeyi geçmemelidir.
3. Metinde sade ve anlaşılır bir yazım dili kullanılmalı, bilimsel yazım tarzı benimsenmeli, gereksiz tekrarlardan kaçınılmalı ve kısaltmalar ilk kullanıldığı yerde tanımlanmalıdır.
4. Bozok Veterinary Sciences'nde yayına kabul edildiği takdirde her türlü yayın hakkının devredildiğine dair beyanları kapsayan "Copyright Form - Yayın Hakkı Devir Sözleşmesinin" sorumlu yazar tarafından imzalanarak pdf formatında gönderilmesi gerekmektedir.
5. Dergiye sunulan çalışmaların "etik kurul onayı" sorumluluğu yazarlara aittir. Bununla beraber Editör, gerektiğinde yazarlardan etik kurul belgesi isteme hakkını saklı tutar.
6. Makalede yer alan tüm yazarların bir bilimsel araştırmacı tanımlama sistemi olan ORCID ID (Open Researcher and Contributor Identifier) kayıt numarası bilgisini makale gönderilme aşamasında sisteme yüklemesi gerekmektedir. ORCID ID kaydı, <http://orcid.org> adresinden ücretsiz yapılabilir.
7. Yazışma adresinde belirtilen yazar; tüm yazışmalardan, makale üzerindeki değişikliklerden (yazar sayı ve sırası dahil) ve yayına kabul edilen yazıların matbaa provasının düzeltilmesinden sorumludur.
8. Elektronik sunum: Yayın inceleme sürecini hızlandırmak amacıyla yazılar tam olarak elektronik olarak sunulmalıdır.
9. Yayımlanması istenen çalışmalar; Microsoft Word 6.0 veya daha üst versiyonda, *Times Roman* yazı karakterinde 12 punto, çift aralıklı, sayfanın tüm kenarlarında 3 cm boşluk olacak şekilde ve ilk sayfadan başlayacak şekilde satır numaraları ile birlikte yazılmalıdır. Çalışmada yer alan yazarlar ile ilgili bilgiler "Başlık Sayfası-Title Page" ile "Esas Doküman-main document" den ayrı sunulmalıdır. Orijinal araştırma ve derleme makalelerinde 16 sayfa, literatür listesi mümkünse ise 30 adet sınırını, şekil ve tablo sayısı ise 8 adet sınırını aşmaması tercih edilmelidir. Kısa bildiri ve olgu sunumlarında 10 sayfayı aşmamalıdır.
10. Bozok Veteriner Bilimleri'ne gönderilen yazılar, aşağıdaki sıraya göre (Başlık, Özet, Metin, Kaynaklar, Tablolar ve Şekiller) düzenlenmeli, Tablo ve Şekiller ayrı sayfalarda belirtilmelidir.
11. Dergiye gönderilen çalışmalar Abstract, Özet, Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Kaynaklar başlıklarından oluşmalıdır. Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma ve Sonuç bölümleri numara verilerek belirtilmelidir (1.Giriş, 2.Materyal ve Metot, 3.Bulgular, 4.Tartışma ve Sonuç). Alt başlıklar 1.1., 1.2., şeklinde ardışık olarak numaralandırılmalıdır. Referanslar bölümü numaralandırılmamalıdır.

a. Başlık: Başlık kısa, açık, tüm harfleri büyük ve yazı için uygun olmalıdır. Özellikle elektronik sunumda makalenin sadece başlığı, (yazar ve kurum adresi vermeksizin) yazılmalıdır. Bu yöntem, yazıların uzmanlarca tarafsız bir şekilde değerlendirilmesini sağlamak amacıyla uygulanmaktadır.

b. Özet: Türkçe yazılarda Türkçe ve İngilizce özet olmalıdır. İngilizce yazılarda Türkçe özet de gereklidir. Özet, 250 kelimeden daha uzun olmamalı; amaç, materyal ve metot, bulgular ile sonucunu içermelidir. Özetlerin

altına 4-6 adet anahtar kelime verilmelidir. Türkçe anahtar kelimeler "Türkiye Bilim Terimleri (TBT)"ne uygun olarak verilmelidir (Bkz. <http://www.bilimterimleri.com>). İngilizce anahtar kelimeler "Medical Subject Headings (MESH)" e uygun olarak verilmelidir (Bkz. <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).

c. Metin: Araştırma makalelerinde; Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular ile Tartışma ve Sonuç bölümleri, olgu sunumlarında ise; Giriş, Olgu Sunumu, Tartışma ve Sonuç bölümleri olmalıdır. Bölüm başlıkları ilk harfi büyük olacak şekilde küçük harfler ile yazılmalıdır. Yazılarda "Systeme International (SI)" birimleri kullanılmalıdır. Derleme makaleler için hazırlanan özet derlemenin konusu hakkında bilgi ve derlemenin amacından oluşmalıdır. Derleme makalesi "Giriş" ile başlamalı, yazar/lar tarafından belirlenecek ara başlıklarla devam etmeli, "Sonuç" ve "Kaynaklar" ile tamamlanmalıdır.

d. Sembol, birim ve kısaltmalar: Dergimiz, *Scientific Style and Format, The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, Council of Science Editors, Reston, VA, USA (7th ed.) tarafından belirtilen sistemi kabul etmektedir. $\times$, μ , η , veya v gibi semboller MS Word sembol listesinden seçilerek kullanılmalıdır. Derece ($^{\circ}$) sembolü gösterimi için; "O" harfinin veya "0" rakamının üst simge şeklinde gösterilmesi ile yapılmamalı sembol menüsünden kullanım tercih edilmelidir. Çarpım "x" harfi değil sembol menüsü ($\times$) kullanılmalıdır. Sayı, birim ve matematiksel semboller (+, -, $\times$, =, <, >), kullanıldıktan sonra bir boşluk bırakılmalı (örneğin, 3 kg), yüzde işaretinden sonra boşluk bırakılmamalıdır (örneğin, %45). Latince et al., in vitro veya in situ terimleri italic olarak gösterilememelidir.

e. Kaynaklar: Kaynaklar metin içinde parantez içinde numara ile belirtilmelidir. Birden fazla kaynağa atıf yapılacaksa aynı parantez içerisinde belirtilmelidir örn, (3,5,7-11). Literatür listesinde yer alan kaynakların her biri için metinde atıf yapılmalıdır.

Beşten fazla yazarı olan kaynaklarda, beşinciden sonrası için "et al." eki kullanılmalı, aşağıda verilen sistematik ile noktalama işaretleri ve yazım kurallarına dikkat edilerek yazılmalıdır.

- a. **Kaynak süreli yayın ise;** Örnek: Durmuş İ, Demirtaş ŞE, Can M, Kalebaşı S. Determining egg consumption habits in Ankara. Tavukçuluk Araştırma Dergisi 2007; 7: 42-45 (article in Turkish with an English abstract).
- b. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. Infection and Drug Resistance 2018; 11: 1645-1658. doi: 10.2147/IDR. S173867.
- c. **Kaynak editörlü kitaptan bir bölüm ise;** Örnek: Gay CC, Besser TE. Escherichia coli septicaemia in calves. Gyles CL. eds. In: Escherichia Coli in Domestic Animals and Humans. Wallingford: CAB International, 1994; pp.75-90.
- d. **Kaynak kitap ise;** Örnek: Varley H, Gowenlock AH, Bell M. Practical Clinical Biochemistry. Fifth Edition. London: William Heinemann Medical Books Ltd, 1984; p. 685.
- e. **Kaynak editörlü kitap ise;** Örnek: Constable PD, Hinckliff KW, Done SH, Grunberg W. Veterinary Medicine. Eleventh Edition. London: W.B. Saunders Company, 2017; p.57.
- f. **Kaynak kongre bildirisi ise;** Örnek: Kırbas A, Degirmencay S., Kilinc AA, Eroglu MS. Increased cardiac troponin-I concentration and cardiac enzyme activities in neonatal calves with sepsis. Second International Veterinary Internal Medicine Congress. October, 11-13, 2019; Ankara-Türkiye.
- g. **Kaynak tez ise;** Örnek: Kırbas A. Elâzığ, Samsun, Sivas, Tokat ve Yozgat illerindeki sığır ve koyunlarda Kırım Kongo Kanamalı Ateş virüs enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması, Doktora tezi, Fırat Üniv Sağ Bil Ens, Elâzığ 2009; s.1-2. (thesis in Turkish with an English abstract).

Web tabanlı erişimler kaynak olarak gösterilmemelidir.

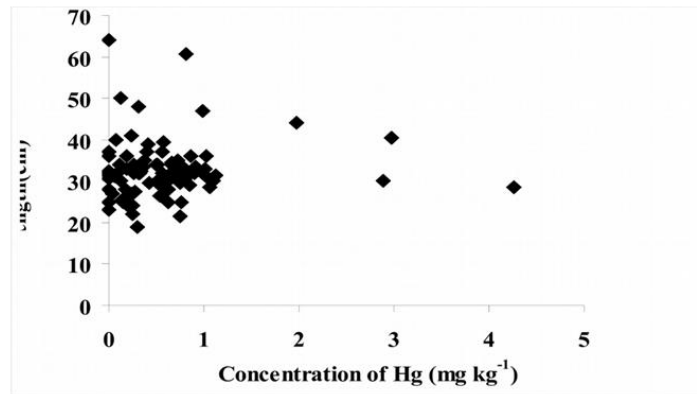
- f. **Tablolar;** kaynaklar kısmından sonra, her bir tablo ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tablo başlıklarının yalnızca ilk harfleri büyük olmalıdır. Tablo başlıkları tablonun üzerinde bulunmalı ve **Tablo 1. (Table 1.)** şeklinde numaralandırılmalıdır. Tablolarda iç ve yan kılavuz çizgiler kullanılmamalıdır. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar tabloların altına yerleştirilmelidir.

Örnek:**Table 1.** Determination of elements in Dogfish Liver certified reference material

Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	Certified ^a	Found ^b	R(%)
A I ^c	200	215 $\pm$ 10	108
V _c	0.6	0.56 $\pm$ 0.01	93
Cr ^c	1.4	1.52 $\pm$ 0.02	109
Co ^c	0.25	0.28 $\pm$ 0.02	112
As	9.66 $\pm$ 0.62	9.55 $\pm$ 0.16	99
Cd	24.3 $\pm$ 0.8	24.2 $\pm$ 0.3	100
Cu	31.2 $\pm$ 1.1	31.7 $\pm$ 0.4	102
Fe	1833 $\pm$ 75	1914 $\pm$ 65	104
Pb	0.16 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.02	100
Hg	2.58 $\pm$ 0.22	2.31 $\pm$ 0.02	90
Ni	0.97 $\pm$ 0.11	0.94 $\pm$ 0.03	97
Se	8.3 $\pm$ 1.3	8.3 $\pm$ 0.2	100
Ag	0.93 $\pm$ 0.07	0.86 $\pm$ 0.01	92
Zn	116 $\pm$ 6	113 $\pm$ 1	97

^a At 95 % confidence level^b $\bar{x} \pm SD$, n=3, ^cInformation value

- g. **Her resim, grafik ve çizim;** şekil olarak kabul edilip **Şekil 1. (Figure 1.)** gibi yazılmalı, her biri ayrı sayfada olacak şekilde verilmelidir. Tanımlayıcı bilgi ve açıklamalar şekil ismi ile birlikte şeklin altına yerleştirilmelidir. Resimler 300dpi çözünürlükte olmalıdır.

Örnek:**Figure 1. Concentration of Hg (mg kg⁻¹)**

Yayının baskı öncesi matbaa provasý yazışmadan sorumlu yazara gönderilir ve üç gün içerisinde kontrol edilerek dergiye geri gönderilmesi istenir.

Her yayın için Bozok Veteriner Bilimleri'nin ilgili sayısı yazışmadan sorumlu yazara gönderilir. Makalelerin PDF türü tam metin dosyalarına derginin web sayfasından erişilebilir.

BOZOK VETERINARY SCIENCES (BOZOK VET SCI)

WRITING RULES

Purpose

In Bozok Veterinary Sciences, by publishing original research articles, case reports, reviews, short papers and letters to the editor with current and original value prepared in the fields of Veterinary Clinical Sciences, Veterinary Preclinical Sciences, Veterinary Basic Sciences, Food Hygiene and Technology, Animal Science and Animal Nutrition. It is aimed to contribute to national and universal science.

Scope

Bozok Veterinary Sciences is the scientific publication of Yozgat Bozok University and is published twice a year, in June and December. The abbreviated name of the journal is Bozok Vet Sci. Bozok Veterinary Sciences, which will start its publication life in 2020, will be published as a peer-reviewed and scientific periodical.

In our journal, an original research article, case report, prepared in the fields of Veterinary Clinical Sciences, Veterinary Preclinical Sciences, Veterinary Basic Sciences, Food Hygiene and Technology, Animal Science and Animal Nutrition, which was prepared in one of the Turkish and English languages and was not presented simultaneously to another journal, Invited and editor-approved reviews, short papers and letters to the editor are published.

WRITING RULES (PREPARATION OF THE ARTICLE-ARTICLE)

1. Responsibilities of the articles belong to their authors. In order for the submitted manuscript to be published, it must be approved by the advisors appointed by the editorial board. No fee or compensation is paid for the articles published in the journal. Unaccepted manuscripts and their appendices will not be returned unless otherwise stated.
2. The publication languages of the journal are Turkish and English. At the beginning of the publication, the Turkish "Abstract" and the English "Abstract" sections should be included. The abstract section should not exceed 200 words.
3. A plain and understandable writing language should be used in the text, scientific writing style should be adopted, unnecessary repetitions should be avoided and abbreviations should be defined where they are first used.
4. If accepted for publication in Bozok Veterinary Sciences, the "Copyright Form - Copyright Transfer Agreement", which includes the declarations regarding the transfer of all kinds of publication rights, must be signed by the responsible author and sent in pdf format.
5. Responsibility for the "ethics committee approval" of the studies submitted to the journal belongs to the authors. However, the Editor reserves the right to request an ethics committee document from the authors when necessary.
6. All authors in the article are required to upload the ORCID ID (Open Researcher and Contributor Identifier) registration number information, which is a scientific researcher identification system, to the system at the time of submitting the article. ORCID ID registration can be done free of charge at <http://orcid.org>.
7. The author specified in the correspondence address; He is responsible for all correspondence, changes on the article (including the number and order of the author) and correction of the printing proof of the articles accepted for publication.
8. Electronic submission: Manuscripts should be submitted fully electronically in order to speed up the publication review process.
9. Studies to be published; It should be written in Microsoft Word 6.0 or higher, in Times Roman font, 12 points, double-spaced, with 3 cm margins on all sides of the page, and with line numbers starting from the first page. Information about the authors in the study should be presented separately from the

"Title Page" and "Main Document". It should be preferred that the original research and review articles should not exceed 16 pages, the literature list should not exceed 30 if possible, and the number of figures and tables should not exceed 8. Short papers and case reports should not exceed 10 pages.

10. Manuscripts sent to Bozok Veterinary Sciences should be arranged in the following order (Title, Abstract, Text, References, Tables and Figures), Tables and Figures should be indicated on separate pages.
11. Studies submitted to the journal should consist of Abstract, Abstract, Introduction, Material and Method, Results, Discussion and Conclusion, References. Introduction, Material and Method, Results, Discussion and Conclusion sections should be numbered (1. Introduction, 2. Material and Method, 3. Findings, 4. Discussion and Conclusion). Sub-headings should be numbered sequentially as 1.1., 1.2.,. The references section should not be numbered.
- a) **Title:** The title should be short, clear, all capital letters and appropriate for the text. Especially in the electronic submission, only the title of the article (without giving the author and institution address) should be written. This method is applied to ensure that the articles are evaluated impartially by experts
- b) **Abstract:** In Turkish articles, there should be an abstract in Turkish and English. Turkish abstracts are also required for English articles. The abstract should not be longer than 250 words; should include the purpose, material and method, findings and conclusion. 4-6 keywords should be given under the abstracts. Turkish keywords should be given in accordance with "Turkish Science Terms (TBT)" (See <http://www.bilimterimleri.com>). English keywords should be given in accordance with "Medical Subject Headings (MESH)" (See <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).
- c) **Text:** In research articles; Introduction, Material and Method, Results and Discussion and Conclusion sections, in case reports; There should be Introduction, Case Report, Discussion and Conclusion sections. Chapter titles should be written in lowercase letters with the first letter capitalized. "Systeme International (SI)" units should be used in manuscripts. The summary prepared for the review articles should consist of information about the subject of the review and the purpose of the review. The review article should start with "Introduction", continue with subheadings to be determined by the author/s, and should be completed with "Conclusion" and "References".
- d) **Symbols, units and abbreviations:** Our journal accepts the system specified by Scientific Style and Format, The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Council of Science Editors, Reston, VA, USA (7th ed.). Symbols such as $\times$, μ , η , or v should be selected from the MS Word symbol list and used. For degree ($^{\circ}$) symbol display; It should not be done by showing the letter "O" or the number "0" as superscript, it should be preferred to use from the symbol menu. Symbol menu ($\times$) should be used, not the product letter "x". Numbers, units, and mathematical symbols (+, -, $\times$, =, <, >) should be followed by a space (e.g. 3 kg), not a percent sign (e.g. 45%). Latin et al., in vitro or in situ terms should not be shown in italics.
- e) **References:** References should be indicated in the text with numbers in parentheses. If more than one source is to be cited, it should be stated in the same parenthesis, eg (3,5,7-11). Reference should be made in the text for each of the sources in the literature list.
12. In references with more than five authors, "et al." suffix should be used, and it should be written in the following systematic, paying attention to the punctuation marks and spelling rules.
 - a) **If the source is a periodical;** Durmuş İ, Demirtaş ŞE, Can M, Kalebaşı S. Determining egg consumption habits in Ankara. Tavukçuluk Araştırma Dergisi 2007; 7: 42-45 (article in Turkish with an English abstract).
 - b) Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. Infection and Drug Resistance 2018; 11: 1645-1658. doi: 10.2147/IDR. S173867.
 - c) **If the source is a chapter from the edited book;** Gay CC, Besser TE. Escherichia coli septicaemia in calves. Gyles CL. eds. In: Escherichia Coli in Domestic Animals and Humans. Wallingford: CAB International, 1994; pp.75-90.
 - d) **If the source book;** Varley H, Gowenlock AH, Bell M. Practical Clinical Biochemistry. Fifth Edition. London: William Heinemann Medical Books Ltd, 1984; p. 685.
 - e) **If the source is an edited book;** Constable PD, Hinckliff KW, Done SH, Grunberg W. Veterinary Medicine. Eleventh Edition. London: W.B. Saunders Company, 2017; p.57.
 - f) **If the source is the congress notice;** Kirbas A, Degirmencay S., Kilinc AA, Eroglu MS. Increased cardiac troponin-I concentration and cardiac enzyme activities in neonatal calves

with sepsis. Second International Veterinary Internal Medicine Congress. October, 11-13, 2019; Ankara-Türkiye

- g) **If the source is thesis**; : Kırbaş A. Elâzığ, Samsun, Sivas, Tokat ve Yozgat illerindeki sığır ve koyunlarda Kırım Kongo Kanamalı Ateş virüs enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması, Doktora tezi, Fırat Üniv Sağ Bil Ens, Elâzığ 2009; s.1-2. (thesis in Turkish with an English abstract).

Web-based access should not be cited as a source.

- f) **Tables**; After the references part, each table should be given on a separate page. Only the first letters of table titles should be capitalized. Table headings should be above the table and numbered as Table 1. (Table 1.). Inside and side guide lines should not be used in tables. Descriptive information and explanations should be placed below the tables.

Sample :

Table 1. Determination of elements in Dogfish Liver certified reference material

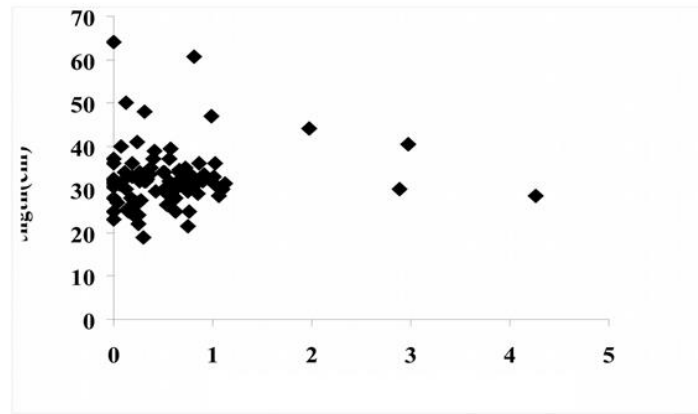
	Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	Certified ^a	Found ^b	R(%)
Al ^c	200	215 $\pm$ 10	108
V ^c	0.6	0.56 $\pm$ 0.01	93
Cr ^c	1.4	1.52 $\pm$ 0.02	109
Co ^c	0.25	0.28 $\pm$ 0.02	112
As	9.66 $\pm$ 0.62	9.55 $\pm$ 0.16	99
Cd	24.3 $\pm$ 0.8	24.2 $\pm$ 0.3	100
Cu	31.2 $\pm$ 1.1	31.7 $\pm$ 0.4	102
Fe	1833 $\pm$ 75	1914 $\pm$ 65	104
Pb	0.16 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.02	100
Hg	2.58 $\pm$ 0.22	2.31 $\pm$ 0.02	90
Ni	0.97 $\pm$ 0.11	0.94 $\pm$ 0.03	97
Se	8.3 $\pm$ 1.3	8.3 $\pm$ 0.2	100
Ag	0.93 $\pm$ 0.07	0.86 $\pm$ 0.01	92
Zn	116 $\pm$ 6	113 $\pm$ 1	97

^a At 95 % confidence level

^b $\bar{x} \pm SD$, n=3, ^cInformation value

Every picture, graphic and drawing; should be accepted as figures and written like Figure 1. (Figure 1.), each one should be given on a separate page. Descriptive information and explanations should be placed under the figure along with the figure name. Pictures must be at 300dpi resolution.

Sample:



**Figure 1. Concentration of Hg (mg
kg⁻¹)**

The prepress proof of the publication is sent to the corresponding author and it is requested to be checked and returned to the journal within three days.

For each publication, the relevant issue of Bozok Veterinary Sciences is sent to the corresponding author. PDF-type full-text files of the articles can be accessed from the journal's web page.

BOZOK VETERİNER BİLİMLERİ
Yayın Hakları Devri Sözleşmesi

Makale Türü: () Araştırma () Olgu Sunumu () Derleme () Kısa bildiri () Editöre mektup

Makale Başlığı:

Biz türü ve başlığı yukarıda belirtilmiş makalenin yazarları olarak; Bozok Veteriner Bilimleri'nin yazım ve yayın şartlarını bilerek ve kabul ederek hazırlayıp yayımlanması dileğiyle Bozok Veteriner Bilimleri Editörlüğüne gönderdiğimiz makalenin orijinal olduğunu, kısmen veya tamamen daha önce yayımlanmadığını veya eşzamanlı olarak başka bir yayın kuruluşuna gönderilmediğini, makale yayımlandıktan sonra ortaya çıkabilecek her türlü bilimsel ve etik sorumluluğun bize ait olduğunu ve Bozok Veteriner Bilimleri'nin hiçbir sorumluluk taşımayacağını, danışman ve dergi editörü tarafından gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı tarihten itibaren Bozok Veteriner Bilimleri'ne devrettiğimizi taahhüt ederiz.

Bununla birlikte yazarların telif hakkı dışında kalan patent vb. tescil edilmiş hakları, yazarların kitap ve dersler gibi çalışmalarında makalenin tümü ya da bir bölümünü ücret ödemeksizin kullanım hakkı, ticari amaçla kullanmamak üzere makaleyi çoğaltma hakkı saklıdır.

Sorumlu Yazar

Adı ve Soyadı:

Adres:

Tel/Fax:

E-posta:

Tarih:.....İmza:.....

Not: Lütfen formu doldurduktan sonra pdf formatında, başlangıç sayfası ve esas doküman ile birlikte e-posta adresimize gönderiniz.

Elektronik posta:

bvs@bozok.edu.tr

bvs@yobu.edu.tr

Adres:

Yozgat Bozok Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Sorgun Meslek Yüksekokulu Binası, Ahmet Efendi Mah. Toki konutları
Yanı 3500.Cad. No:4 66700 SORGUN/YOZGAT

BOZOK VETERINARY SCIENCES
COPYRIGHT RELEASE FORM

Article Type: ☐ Research ☐ Case Report ☐ Review ☐ Short Paper ☐ Letter to Editor

Manuscript Title:
.....

As the authors of the article whose type and title are mentioned above; We wish to prepare and publish Bozok Veterinary Sciences with the knowledge and acceptance of the editorial and publication terms, and the article that we sent to Bozok Veterinary Sciences Editor is original, partially or completely not published before or not sent to another publication institution simultaneously, any scientific and ethical issues that may arise after the article is published. We undertake that we are responsible and that Bozok Veterinary Sciences will not bear any responsibility, and that we have transferred all rights of publication to Bozok Veterinary Sciences as of the date of publication, together with the corrections required by the consultant and journal editor.

However, patents, other than the copyright of the authors, etc. registered rights, authors' right to use all or part of the article free of charge in their works such as books and lessons, and the right to reproduce the article for non-commercial use.

Corresponding Author

Name and Surname:

Address:

Phone/Fax:

E-mail:

Date:..... Signature:.....

Notes: Please fill the form and send it to our e-mail address in pdf format with the start page and the main document.

E-mail: bvs@bozok.edu.tr

bvs@yobu.edu.tr

Adress: Yozgat Bozok University, Faculty of Veterinary Medicine, Sorgun Vocational School Building, Ahmet Efendi Mah. Toki konutları Yanı 3500.Cad. No:4 66700 SORGUN/YOZGAT

