



Official Publication of  
The Afyon Kocatepe University  
Faculty of Veterinary Medicine

# K o c a t e p e Veterinary Journal

2019, 12(4), December



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

<http://www.kvj.aku.edu.tr>

**DergiPark**  
AKADEMİK



**ADVISORY BOARDS**

**Publisher**

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

**Editor in Chief**

Assoc. Prof. Dr. Zeki GÜRLER

**Editors**

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

**Section Editors**

Prof. Dr. Alpaslan YILDIRIM  
Prof. Dr. Kerem URAL  
Prof. Dr. Sadullah BAHAR  
Prof. Dr. Akın YAKAN  
Prof. Dr. Kemal Kaan TEKİNŞEN

**Foreing Language Editor**

Prof. Dr. İbrahim DEMİRKAN  
Assist. Prof. Dr. Ulaş ACARÖZ

**Statistics Editors**

Assoc. Prof. Dr. İbrahim KILIÇ  
Assist. Prof. Dr. İlky DOĞAN

**Organising Committee**

Prof. Dr. Fatih FİDAN  
Assoc. Prof. Dr. Metin ERDOĞAN  
Assoc. Prof. Dr. Mustafa KABU  
Assoc. Prof. Dr. Fatih AVDATEK  
Dr. Eyüp Eren GÜLTEPE  
Dr. Barış DENK

Prof. Dr. Arif Altuntaş

Prof. Dr. Atilla Şimşek

Prof. Dr. Cevdet Uğuz

Prof. Dr. Yavuz O. Birdane

Prof. Dr. İbrahim Demirkan

Prof. Dr. İlhami Çelik

Prof. Dr. İsmail Bayram

Prof. Dr. Abdullah Kaya

Prof. Dr. Mustafa Alisharlı

Prof. Dr. Nalan Baysu Sözbilir

Prof. Dr. Recep Aslan

Prof. Dr. Seyfullah Haliloğlu

Prof. Dr. Zafer Karaer

Prof. Dr. Zehra Bozkurt

Prof. Dr. İbrahim Taşal

Prof. Dr. Şule Kaya

Prof. Dr. Korhan Altunbaş

Prof. Dr. Aysun Demirkan

Prof. Dr. Hasan Çiçek

Prof. Dr. Fatih M. Birdane

Assoc. Prof. Dr. Süleyman Aypak

Assoc. Prof. Dr. Oktay Yılmaz

Assoc. Prof. Dr. İbrahim Kılıç

Assist. Prof. Dr. M. Fatih Bozkurt

Ankara University -Turkey

Selçuk University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Ondokuz Mayıs University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Ankara University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Mehmet Akif Ersoy University-Turkey

Mehmet Akif Ersoy University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Adnan Menderes University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

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

*Kocatepe Veterinary Journal;*

*indexed in TUBİTAK-ULAKBİM TR-Dizin, Turkey Citation Index, CAB Abstract, ResearchBib, SIS (Scientific Indexing Services), CiteFactor, CrossRef, Index Copernicus, Google Scholar, SJIFactor*

*Addressed:*

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

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

[www.kvj.aku.edu.tr](http://www.kvj.aku.edu.tr)

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

**\*Only accepts online submission\***

**RESEARCH ARTICLES**

<b>Tie-in Configuration Applications in The Fractures of Extremity Long Bones in Cat</b> ( <i>Kedilerde Ekstremitte Uzun Kemiklerinin Kırıklarında Tie-in Konfigürasyon Uygulamaları</i> ) Mehmet SAĞLAM, Sara KHOUSHNAHAD, Murat ÇALIŞKAN	370-377
<b>Effects of Rubber Flooring on Feeding and Resting Behavior of Dairy Buffalo and Cows</b> ( <i>Sünger Altılık Uygulamasının Sütçü Mandalar ve Ineklerde Beslenme ve Dinlenme Davranışları Üzerine Etkileri</i> ) Eyüp Eren GÜLTEPE, İbrahim Sadi ÇETİNGÜL, İsmail BAYRAM, Hesna KANDIR, Beytullah KENAR, Tuba BÜLBÜL, Cangir UYARLAR, Ümit ÖZÇINAR	378-383
<b>Antibiotic Resistance of Stenotrophomonas maltophilia Strains Isolated from Horses</b> ( <i>Atlardan İzole Edilen Stenotrophomonas maltophilia Suşlarının Antibiyotik Direnci</i> ) Uçkun Sait UÇAN, Bilal Osamah MOHAMMED, Murat YİĞİT	384-388
<b>Physicochemical Characteristics and Antioxidant Capacity of Traditional Yogurt Fortified with Grape (Vitis vinifera L.) Seed Extract at Different Levels</b> ( <i>Üzüm (Vitis vinifera L.) Çekirdeği Ekstraktı ile Zenginleştirilmiş Geleneksel Yoğurdun Fizyokimyasal Özellikleri ve Antioksidan Kapasitesi</i> ) Dilek DEMİRBÜKER KAVAK, Bilge AKDENİZ	389-395
<b>Determination of D-Dimer Levels in Calves with Cryptosporidiosis</b> ( <i>Kriptosporidiazisli Buzağlarda D-Dimer Seviyelerinin Belirlenmesi</i> ) Cenker Çağrı CINGI, Mustafa KABU, Hasan ERDOĞAN, Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU, Kerem URAL	396-399
<b>The New Mastitis Agents Emerged in Cattle in Turkey and An Investigation of Their Antimicrobial Susceptibility</b> ( <i>Türkiye'de Yeni Sığır Mastitis Ajanları ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Araştırılması</i> ) Beytullah KENAR, Adil AKSOY, Zahide KÖSE	400-406
<b>Evaluation of Antifungal Activity of Some Benzothiazole Derivatives</b> ( <i>Bazı Benzotiyazol Türevlerinin Antifungal Aktivitesinin Değerlendirilmesi</i> ) Derya OSMANİYE, Begüm Nurpelin SAĞLIK, Ulviye ACAR ÇEVİK, Mustafa ESER	407-412
<b>Allergen Determination with Detection of Serum Specific IgE in Dogs with Atopic Dermatitis from Samsun and Vicinity</b> ( <i>Samsun İli ve Çevresindeki Atopik Dermatitisi Köpeklerde Serum Spesifik IgE Tespiti ile Alerjen Tayini</i> ) Öykü BARILI, Didem PEKMEZCİ	413-423
<b>Prevalence of Methicillin Resistance and Panton-Valentine Leukocidin Genes in Staphylococci Isolated from Pirlak Sheep with Subclinical Mastitis in Turkey</b> ( <i>Türkiye'de Subklinik Mastitisli Pirlak Koyunlardan İzole Edilen Stafilkoklarda Metisilin Direnç ve Panton-Valentine Lökosidin Genlerinin Prevalansı</i> ) Esra ŞEKER, Erhan ÖZENÇ, Duygu BAKİ ACAR, Müesser YILMAZ	424-429
<b>Determination of Persistent Organic Pollutants in Water and Sediment Samples from Kızılırmak River</b> ( <i>Kızılırmak Nehri'nden Alınan Su ve Sediment Örneklerinde Kalıcı Organik Kirleticilerin Tespiti</i> ) Özgür KUZUKIRAN, Ayhan FİLAZİ, Pınar ARSLAN, Begüm YURDAKÖK-DİKMEN, Ülkü Nihan YAZGAN TAVŞANOĞLU	430-436
<b>Abattoir-Based Survey of Mastitis in Cattle in Afyonkarahisar Province</b> ( <i>Afyonkarahisar İlinde Sığırlarda Mezhaba Bazlı Mastitis Taraması</i> ) Erhan ÖZENÇ, Esra ŞEKER, Müesser YILMAZ	437-442
<b>The Prevalence of Gastrointestinal Helminths in Domestically Farmed Chicken in Van, Turkey</b> ( <i>Van İlinde Ev Kimeslerinde Yetiştirilen Tavuklarda Gastrointestinal Helmintlerin Prevalansı</i> ) Vural DENİZHAN, Ayşe KARAKUŞ	443-447
<b>An Assessment of Compliance with The European and National Minimum Requirements on Calf Welfare of Dairy Cattle Farms in İzmir Province</b> ( <i>İzmir İlindeki Süt Sığırı İşletmelerinin Buzağı Refahı Bakımından Avrupa Birliği ve Ulusal Minimum Gerekliliklere Uyumunun Değerlendirilmesi</i> ) Zehra Bozkurt, Mustafa MUTLU	448-455
<b>Factors Affecting Poultry Meat Consumption Status and Consumption Habits of Students From Faculty of Veterinary Medicine</b> ( <i>Veteriner Fakültesi Öğrencilerinin Beyaz Et Tüketimi Üzerine Etki Eden Faktörlerin Değerlendirilmesi</i> ) Ahmet Cumhur AKIN, Mustafa Bahadır ÇEVİRİMLİ, Burak MAT, Mehmet Saltuk ARIKAN, Mustafa Agah TEKİNDAL	456-462
<b>Microbiological Quality of Organic Chicken Meat</b> ( <i>Organik Tavuk Etlerinin Mikrobiyolojik Kalitesi</i> ) Reşat ÇİFTÇİ, Hüsnü Şahan GÜRAN	463-468

**CASE REPORT**

<b>Ebstein Anomaly in a French Mastiff</b> ( <i>Bir Fransız Mastiff'te Ebstein Anomali</i> ) Turan CİVELEK, Durmuş Fatih BAŞER, Z. Kadir SARITAŞ, Ahmet Cihat TUNÇ	469-473
---	---------



## Tie-in Configuration Applications in The Fractures of Extremity Long Bones in Cat

Mehmet SAĞLAM<sup>1\*</sup>, Sara KHOUSHNAHAD<sup>1</sup>, Murat ÇALIŞKAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara University, Veterinary Faculty, Surgery Department, 06300, Ankara, Turkey

### ABSTRACT

The aim of this study to compare clinical examination and radiographical evaluations of Tie-in configurations in clinical cases which is indicated and results of cats long extremity fractures. The study material consisted of 23 cats of different breed, age and gender, who were fractured in extremity long bones as a result of clinical and radiographic examinations brought with the complaint of not being able to use the front or hind limbs. The tie-in configuration was applied in 2 humerus, 15 femur, 4 tibia, 1 femur and tibia and 1 humerus and femur fractures (total; 3 humerus, 17 femur, 5 tibia). Postoperative 10,21,30,45<sup>th</sup> days clinical and radiographical examinations of cases performed. Modified Tie-in external fixator removed at 45-60<sup>th</sup> days after the operation. Followed up 22 cases recovered without any problems and one case did not result in functional recovery after infection of the operation site. In conclusion, it was declined that the Tie-in configuration method is succesful to stabilize the fracture line of long bone fractures during reduction of fracture bone fragments in the cats.

**Keywords:** Cat, external fixator, fracture, Tie-in, treatment.

\*\*\*

### Kedilerde Ekstremitte Uzun Kemiklerinin Kırıklarında Tie-in Konfigürasyon Uygulamaları

#### ÖZ

Bu çalışmada, kedilerde karşılaşılan ekstremitte uzun kemiklerinin kırıklarında klinik olgularda endike olduğu durumlarda Tie-in konfigürasyonunun sağaltım uygulamaları ile sonuçlarının klinik ve radyolojik değerlendirmelerinin yapılması ve aktarılması amaçlanmıştır. Çalışma materyalini ön veya arka ekstremitelerini kullanamama şikâyeti ile getirilen, klinik ve radyografik muayeneler sonucunda ekstremitte uzun kemiklerinde kırık belirlenen değişik ırk, yaş ve cinsiyetteki toplam 23 kedi oluşturdu. Akrilik ile modifiye Tie-in konfigürasyonu 2 humerus, 15 femur, 4 tibia, 1 femur ile tibia ve 1 humerus ile femur'da belirlenen kırıkların (toplam; 3 humerus, 17 femur, 5 tibia) sağaltımında uygulanmıştır. Postoperatif dönemde, olguların 10, 21, 30 ve 45. günlerinde klinik ve radyografik kontrolleri yapıldı. Modifiye Tie-in eksternal fiksator apareyi 45-60. günlerde uzaklaştırıldı. İzlenen olgulardan 22 olguda herhangi bir sorun olmaksızın iyileşme sağlanırken, 1 olguda da operasyon bölgesinde gelişen enfeksiyon nedeniyle klinik fonksiyonel iyileşme sağlanamadı. Tie-in konfigürasyon yönteminin kedilerde ekstremitte uzun kemik kırıklarında kırık fragmentlerinin redüksiyonu sonrasında stabilizasyonunu sağlamada uygun olduğu ve kırık sağaltımının başarıyla sonuçlandırabileceği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Eksternal fiksator, kedi, kırık, sağaltım, Tie-in.

To cite this article: Sağlam M, Khoushnabad S, Çalışkan M. Tie-in Configuration Applications in The Fractures of Extremity Long Bones in Cat. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4):370-377.

Submission: 10.05.2019

Accepted: 14.09.2019

Published Online: 07.10.2019

ORCID ID; MS: 0000-0001-8934-8529, SK: 0000-0002-2706-5563, MÇ: 0000-0002-1694-102X

\*Corresponding author e-mail: saglam45@gmail.com

## GİRİŞ

Veteriner ortopedide ekstremite kemiklerinin kırıkları oldukça sık görülür. Köpek ve kedilerde bu kırıkların oluşumunda; çoğunlukla travmalar, trafik kazaları, yüksekten düşme, ateşli silah yaralanmaları ve hayvanların birbiriyle olan kavgaları gibi birçok neden sayılabilir (Süer ve Sağlam 2006).

Kırık sağaltımında biyolojik ve mekanik olmak üzere iki metot uygulanmaktadır. Biyolojik metotta kırık uçları sebebiyle oluşan damarsal dokulardaki hasarın dışında vasküler bozukluk söz konusu değildir. Dolayısıyla yumuşak dokunun korunmasıyla hızlı bir iyileşme sağlanır (Palmer 1999).

Mekanik metot ise, ana kemik fragmentlerinin bir araya getirilerek fiksasyon materyalinin uygulanması ile yapılır. Bu iki metot içinde esas hedef, kırılan kemiğin anatomik şeklini yeniden kazandırmak, en kısa sürede iyileşmeyi sağlamak, maksimum hasta rahatlığı ve en az maliyetle hastayı sağlığına kavuşturmadır (Palmer 1999).

Bu hususların yerine getirilmesi için eksternal fiksasyon uygun bir yöntemdir. Eksternal fiksasyon yöntemi, beşeri ve veteriner hekimlikte sıklıkla kırıkların sağaltımında, eklem stabilizasyonu ve bacak deformitesini düzeltmek amacıyla kullanılmaktadır. Eksternal fiksatörler diğer yöntemlere göre, apareyin çok yönlü montajının yapılabilmesi, açık kırıklarda etkin yara yönetimini sağlaması, kırık yerindeki damarlanmanın minimal düzeyde bozulması ve az maliyeti nedeniyle daha avantajlı sayılmaktadır (White ve ark. 2003).

### Genellikle eksternal fiksatörler;

- Tip II ve Tip III açık ve/veya enfekte kırıklarda,
- Ciddi yanıklarla veya geniş doku yaralanmaları ile birlikte oluşan kırıklarda,
- İnternal fiksasyonun mümkün olmadığı ve distraksiyon gerektiren kırıklarda,
- Pelvis kırıkları ve dislokasyonları ile multiple kapalı kırıkların fiksasyonunun sağlanmasında,
- Doğusal veya edinsel nedenlerle oluşan kısıklardaki ekstremite uzatmalarında,
- Kronik osteomyelitisli olgularda,
- Artrodez uygulamalarında,
- Kırıkla beraber damar-sinir onarımı gereken olgularda,
- Kırık immobilizasyonu ve kanatlı hayvanlarda oluşan ekstremite kırıklarının sağaltımında kullanılabilir (Bilgili ve Olcay 1998; Çam 2008).

Eksternal fiksatörler tip I, II, III ve sirküler olarak sınıflandırılmaktadır. Kuvvet ve dayanıklılık yönünden sıralama; Tip IA < Tip IB = Tip I Tie-in < Tip II < Tip III şeklindedir (Krause ve ark. 2003).

İntramedüller pin ve eksternal fiksatörün kombinasyonu olarak bilinen Tie-in tekniği kedi ve küçük yapılı köpek ırklarındaki plak uygulamasının bir alternatifidir. İntramedüller pinler, aksial güçlere karşı dayanıklılık gösterirken, transversal uygulanan Schanz pinleri rotasyonel ve kompresyonel güçlere direnç gösterir. Bu özellikleri ile kedi ve köpeklerde tibia, femur ve humerus kırıklarında rijid fiksasyon sağlamak için rod ve klamp yerine akrilik ile birleştirilmiş eksternal olarak uygulanan Schanz pinleri ve internal olarak uygulanmış Steinmann pinleri Tie-in tekniğinde kombinasyonu tamamlar (Sağlam ve ark. 2016).

Özellikle femur'un yoğun kas gurupları tarafından çevrili olması pin yerleşimi için güçlük yaratır ve bu durumda postoperatif morbidite riski ciddi olarak artar. Tie-in uygulaması stabilizasyonu iki kat artırıp intramedüller pinlerin migrasyonunu engeller (Beale 2004).

Bu çalışmada, kedilerin ekstremite uzun kemiklerinde oluşan kırıkların nedenleri, şekli ve lokalizasyonuna göre endike olan eksternal fiksasyon yöntemlerinden Tie-in konfigürasyonu uygulamasının önemli özelliklerinden; kırık bölgesine uygulanan güçleri nötralize etmesi, uygulama direncini ve stabilitenin iki kat artmasını sağlaması yanında, intramedüller pinlerdeki migrasyonu engellemesiyle klinik olgulardaki uygulamaları ile sağaltım sonuçlarının klinik ve radyolojik değerlendirmelerinin, bu konuda çalışan klinisyenler için yönlendirici olması ve benzer çalışmalar için katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Çalışma, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 29.03.2017 tarih ve 2017-7-57 sayılı kararı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

*Çalışma Materyalini Oluşturan Olgular:* Çalışma materyalini, Mart 2017-Mart 2018 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı Kliniği'ne ön veya arka ekstremitelerini kullanamama şikayeti ile getirilen, klinik ve radyografik muayeneler sonucunda ekstremite uzun kemiklerinde diyafizer kırık belirlenen değişik ırk, yaş ve cinsiyetteki toplam 23 kedi oluşturdu.

*Çalışmada kullanılan aletler:* Yapılan operasyonlarda rutin yumuşak doku ve ortopedi seti kullanıldı. İmplant olarak 1-2 mm Steinmann pin ve 1-2 mm Schanz pin ile gerektiğinde bazı olgularda serklaj teli kullanıldı.

Bütün olgularda eksternal fiksator, akrilik maddesiyle modifiye kullanılmıştır. Akrilik maddesi; metil metakrilat tozu ve sıvı monomerin karışımından oluşan bir malzemedir. Polimetilmetakrilat bazı akrilikler polimerizasyon esnasında sertleşme fazında bir ekzotermik reaksiyona girer. Polimerizasyon fazındaki akrilikten oluşan ısı yumuşak doku ve kemiklerde hasara sebep olmaktadır. Bu nedenle akrilik kolon ile yumuşak doku ve kemik doku arasında bırakılan en az 1 cm'lik uzaklık sıcaklığın dokulara geçişini önler. Çalışmada kullanılan serum fizyolojik, transfüksasyon pinlerin üzerine damlatılmasıyla termal iletimin daha düşük olmasını sağlamıştır.

*Eksternal Fiksator Uygulaması:* Ekstremitte uzun kemiklerinde kırık belirlenen 23 kedide eksternal fiksator aparey ile fiksasyon sağlandı. Fiksasyon için kullanılan Schanz ve Steinmann pinleri kemiğe uygun çapta seçildi ve akrilik ile sabitleştirildi. Olgu no. 1'de kapalı redüksiyon uygulandı. Açık redüksiyon gerektiren olgularda, kırık hattına sınırlı yaklaşım ile redüksiyon gerçekleştirildi. İntramedüller uygulanan Steinmann pinleri medüller kanal genişliğinden daha küçük çapta seçildi, sonra kırık hattının distal ve proksimal bölümüne birer Schanz pini transversal olarak yerleştirildi. Steinmann pin ve Schanz pinleri birleştirildikten sonra akrilik yardımı ile sabitlenerek Tie-in konfigürasyon yöntemi tamamlandı. Bazı olgularda (olgu no. 5,10,13,15,16,17,22) serklaj teli eksternal fiksatöre destek olarak kullanıldı.

*Serklaj Teli Uygulaması:* Kırığın redüksiyon sonrasında endike olgularda örneğin tek parçalı oblik veya parçalı kırıklarda ve kırık hattının kemik çapından en az iki kat büyük olan kırıklarda (olgu no. 5,10,13,15,16,17,22) serklaj teli stabilizeye destek olarak kullanıldı. Bu uygulamada serklaj teli altında yumuşak doku kalmayacak şekilde kırık hattına sirküler olarak pin tutucu ile düğümlendi ve yumuşak doku travması yaratmaması için düğümlenen uç kesilerek kemiğin üzerine yaslandırıldı.

## BULGULAR

Çalışma olgularını 23 kedi oluşturdu. Olguların cinsiyet dağılımı 11 dişi ve 12 erkek, yaş dağılımları ise 2 kedi 6ay-1 yaş arası, 13 kedi 1-2 yaş arası ve 8 kedi 3 yaş ve üstü olarak belirlendi. Kırıkların dağılımında ise; 2 humerus (olgu no. 2,19), 15 femur (olgu no. 3-

8,10-13,16,17,21,22,23), 4 tibia (olgu no. 1,9,14,18) (Şekil 8), 1 femur ve tibia kırığı (olgu no. 15), 1 humerus ve femur (olgu no. 20) olduğu saptandı.

Yüksekten düşme sonucu 12 olguda oluşan kırığın lokalizasyonu; 2 olguda (olgu no. 2,20) diyafizer humerus kırığı, 8 olguda (olgu no. 6,7,10,12,13,20,21,22) diyafizer femur kırığı, 3 olguda (olgu no. 1,9,14) ise diyafizer tibia kırığı olarak belirlendi.

Trafik kazasını sonucu 11 olguda oluşan kırığın lokalizasyonunda ise; 1 olguda (olgu no. 19) diyafizer humerus kırığı, 9 olguda (olgu no. 3,4,5,8,11,15,16,17,23) diyafizer femur kırığı, 2 olguda (olgu no. 15,18) ise diyafizer tibia kırığı olduğu belirlendi.

Olgularda postoperatif 10. günde deri dikişleri alındı. Uygulanan pansumanlar 10, 21 ve 45. günlerde değiştirilerek eksternal fiksator 45-60. günlerde uzaklaştırıldı. Olgu no. 7'de postoperatif dönemde gelişen pin dibi enfeksiyonu nedeniyle iyileşme süresi uzadı, ancak klinik fonksiyonel iyileşme sağlandı.

Olgu no. 1'de postoperatif dönemde hasta sahibinin yaşam alanı bahçe olan kediyi kontrolünde tutamaması nedeniyle, operasyon bölgesinde pin dibi enfeksiyonu gelişmiş ve 30. günde eksternal fiksator uzaklaştırılmıştır. Destekli bandaj ve İM pin uygulanarak postoperatif kontrolleri sürdürülerek klinik fonksiyonel iyileşme sağlandı.

Yüksekten düşme sonucu kliniğe getirilen olgu no. 9'da tibia'da diyafizer kırık şekillenmiş olup (Şekil 1), açık redüksiyon ile kırık stabilizasyonları Steinmann pini ve Shanz pini ile Tie-in yöntemiyle sağlanmıştır (Şekil 2). Hastanın 45.gün postoperatif kontrolünde klinik fonksiyonel iyileşme sağlandığı gözlenmiştir (Şekil 3).

Trafik kazası sonucu kliniğe getirilen olgu no. 11'de femur'da diyafizer kırık şekillenmiş olup (Şekil 4), açık redüksiyon ile kırık stabilizasyonları Steinmann pini ve Shanz pini kullanımıyla Tie-in yöntemi ile sağlanmıştır (Şekil 5). Hastanın 30.gün radyografik muayenesi yapılmış olup (Şekil 6), 45.gün postoperatif kontrolünde klinik fonksiyonel iyileşme belirlenmiştir (Şekil 7).



**Şekil 1.** Olgu no 9'un preoperatif A/P ve M/L radyografik görünümleri.  
**Figure 1.** Preoperatif A/P and M/L radiographic appearances of case 9.



**Şekil 2.** Olgu no 9'un postoperatif A/P radyografik görünümleri.  
**Figure 2.** Postoperatif A/P radiographic appearances of case 9.

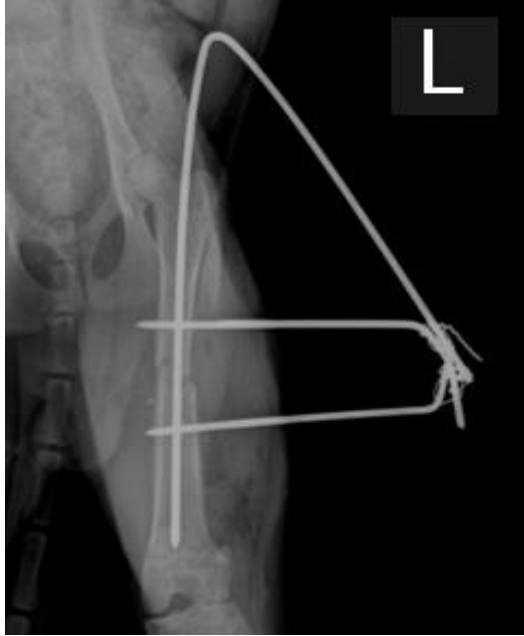


**Şekil 3.** Olgu no 9'un postoperatif 45.gün M/L radyografik görünümleri.  
**Figure 3.** Postoperatif 45.day M/L radiographic appearances of case 9.



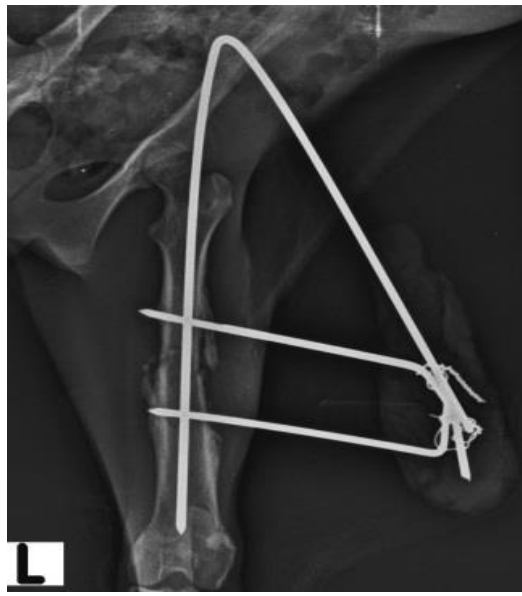
**Şekil 4.** Olgu11'in preoperatif A/P radyografisi.

**Figure 4.** Preoperatif A/P radiographic appearances of case 11.



**Şekil 5.** Olgu 11'in postoperatif 1.gün radyografisi.

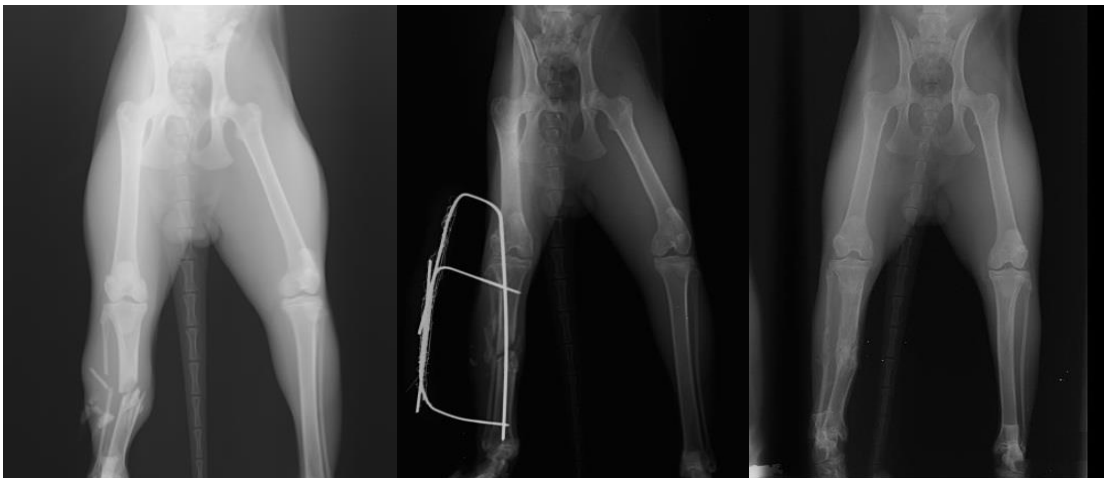
**Figure 5.** Postoperatif first day radiographic of case 11.



**Şekil 6.** Olgu 11'in 30.gün radyografisi.  
**Figure 6.** Postoperatif 30.day radiographic appearances of case 11.



**Şekil 7.** Olgu 11'in 45.gün radyografisi.  
**Figure 7.** Postoperatif 45.day radiographic appearances of case 11.



**Şekil 8.** Olgu no 14'de sağ tibia'nın preoperatif, postoperatif ve 60. gün A/P radyografileri.  
**Figure 8.** Preoperative, postoperative and 60<sup>th</sup> day A/P radiographic appearances of riht tibia case 14.



## TARTIŞMA ve SONUÇ

Kedilerde karşılaşılan ekstremitelerde uzun kemik kırıklarının dağılımı; humerus %5-10, antebrachium %15-18, femur %20-25, tibia %20-23 olarak bildirilmiştir (Sağlam ve Kendir 2012; Yeşilören 2011). Çalışma olgularında rastlanan ekstremitelerde uzun kemik kırıklarının dağılımı humerus %10, femur %71, tibia %19 oranında olmasıyla literatür verilerce farklılık göstermiştir.

Eksternal fiksasyon uygulamalarında en uyumlu ve en etkin sonuç tibia bölgesinde alınır. Bunu radius-ulna, femur ve humerus izler (Krause ve ark. 2003). Çalışmada olgu no. 15'de akrilikle modifiye Tie-in konfigürasyon yöntemi, aynı anda femur ve tibia'da da uygulanmıştır. Olgu kısa bir süre sonra ekstremitayı kullanmaya başladı, ancak postoperatif dönemde tibia'da gelişen osteomyelitis sonrasında ilerleyici özellikte nekroz gözlenmiş ve eksternal fiksatör uzaklaştırılarak, ekstremitenin amputasyonuna karar verilmiştir.

Fiksasyon pinlerinin gevşemesi ve pin yolunun enfeksiyonu sık görülen komplikasyonlar arasındadır (White ve ark. 2003). Özellikle pin dibi enfeksiyonu en çok rastlanan komplikasyonlar arasındadır (Bilgili ve ark. 2014). Çalışmada iki olguda (olgu no. 13'de femur, olgu no. 15'de femur ve tibia) uygulanan eksternal fiksasyonda pin dibi enfeksiyonu ve pin migrasyonu gözlenmiştir.

Deri iritasyonu ve pin yolu enfeksiyonu durumunda lokal sağaltım girişimi ile genel antibiyotik uygulamaları yapılır (Tobias ve Johnston 2012). Çalışmada pin dibi enfeksiyonu ve pin migrasyonu gözlenen olgu no. 13 ve 15'de lokal sağaltım ve genel antibiyotik uygulamalarından sonuç alınamamıştır. Olgu no. 13'de revizyon operasyonu, olgu no. 15'de ekstremitelerde amputasyonu gerçekleştirildi.

Uzun kemiklerin instabil, parçalanmış kırıklarının sağaltımında üç farklı osteosentez yöntemi uygulanır. Bunlar; eksternal fiksasyon, plak ve vidalama sistemi ile intramedüller kilitli çivilemedir. Serklaj telleri ve trifon vidalar gerektiğinde ek destek için kullanılabilir. Eksternal fiksasyon endikasyonlarında kullanılan Tie-in konfigürasyon sistemi içinde yer alan intramedüller pinler bu sistemin etkinliğini artırmaktadır (Krause ve ark. 2003). Çalışmada 7 olguda (olgu no. 5,10,13,15,16,17,22) ek destek olarak serklaj teli kullanımına da gereksinim olmuştur.

Sadece intramedüller pin veya Tip I A eksternal fiksatörlerin uygulandığı olgularla karşılaştırıldığında, akrilik ile modifiye olan Tie-in fiksatörleri uygulamalarında morbidite riski daha fazladır. Ancak Tie-in yönteminde intramedüller pinlerin uzaklaştırılması işlemi daha kolaydır. Dolayısıyla sadece intramedüller pin uygulamasında ortaya

çıkabilecek olan pin migrasyonu ve nervus ischiadicus'un olumsuz etkilenme riski akrilik ile kombine edilmiş Tie-in yönteminde minimize edilir. Geleneksel Tip I A eksternal fiksatöre göre daha rijid bir fiksasyon sağlaması da diğer bir avantajı olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca açık kırıklarda bölgenin kontrol edilebilmesi avantajı yanında, implantın kolayca uzaklaştırılabilirliği ve uygulandığı yerde implantın kalmaması da Tie-in yönteminin bir diğer avantajıdır.

Her yöntemde olduğu gibi, Tie-in fiksasyonun da avantajları yanında dezavantajları vardır. Bu yöntemde en çok rastlanan komplikasyonlar, pin dibi enfeksiyonların oluşması ve pin migrasyonudur. Bu gibi komplikasyonların sağaltımında lokal antibiyotik uygulamaları ve sık bandaj değişimi iyileşme süresini hızlandırmaktadır, bunun yanında postoperatif bakımı, düzenli kontrol ve hasta sahibinin bilgilendirilmesiyle ilgisi de önemlidir.

Çalışmada kullanılan akrilikle modifiye Tie-in eksternal fiksatörlerinin bir diğer avantajı ise, klasik eksternal fiksatörlere göre sağladığı rijid fiksasyonun stabilizasyonu iki kat artırmasıyla intramedüller pin migrasyonunu engellemesidir. Çalışmadaki 23 olgudan 22'sinde özellikle yukarıda belirtilen avantajı nedeniyle başarılı sonuç alınmış olup, 1 olguda aynı ekstremitedeki femur ve tibia'da eş zamanlı sağaltım uygulanmış ve karşılaşılan osteomyelitis nedeniyle ekstremitenin amputasyonu gerekmiştir.

Sonuç olarak; humerus, femur ve tibia gibi ekstremitelerde uzun kemiklerinin kırıklarında uygulanan Tie-in yöntemi ile başarılı sonuçlar alınmıştır. Ancak postoperatif bakım ve kontrolün periyodik olarak yapılması sağaltımdaki başarıyı artıracakları unutulmamalıdır.

## TEŞEKKÜR

*Sara KHOUSHNAHAD; Tezli Yüksek Lisans Tez çalışmasından özetlenmiştir. Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 29.3.2017 tarih ve 2017-7-57 Karar no'lu Etik kurul belgesi alınmıştır.*

## KAYNAKLAR

- Beale B.** Orthopedic Clinical Techniques Femur Fracture Repair. Clin Tech Small Anim Pract, 2004; 19: 134-150.
- Bilgili H, Olcay B.** İlizarov'un sirküler eksternal fiksasyon sistemi. Bölüm 1. Sistemin tarihçesi, bölümleri, endikasyonları ve prensipleri. Veteriner Cerrahi Dergisi, 1998; 4(3-4): 62-66.
- Bilgili H, Gül Sancak İ, Ulusan S, Özdemir Ö.** Treatment of tibial fractures in seven cats using circular external skeletal fixation. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 2014; 61: 173-178.
- Çam R.** Eksternal Fiksatörlü Hastaların Uzun Süreli Bakım ve İzlenmelerinin Komplikeasyonlara Etkisi. Doktora Tezi,

- Krause KH, Toombs JP, Ness MG.** Basics of External Fixation, External Fixation in Small Animal Practice. Blackwell Science Ltd, A Blackwell Publishing Company, 2003; chapter 1 p.: 5-15, chapter 6 p.: 43-52, chapter 8 p.:61-68, chapter 12 p.: 88-99.
- Palmer RH.** Biological Osteosynthesis. Vet. Clinic. North Am. Small Anim. Prac., 1999; 29(5): 1171-1158.
- Sağlam M, Çağatay S, Khoushnahad S.** A modification of Tie-in external fixation technique via acrylic in small animals. 26th International Scientific Conference, 2-3 June 2016, Stara Zagora-Bulgaria, Volume VI, Number 5: Veterinary Medicine, Animal Studies, 2016; 1-8.
- Sağlam M, Kendir B.** Kedilerde karşılaşılan humerus kırıkları ve sağaltım sonuçlarının klinik olarak değerlendirilmesi. Vet Hekim Der Derg, 2012; 83(1): 65-72.
- Süer C, Sağlam M.** Köpeklerde Arka Ekstremitte Travmatik Lezyonlarının Dağılımı ve Sağaltımı Üzerine Klinik Çalışmalar. Ankara Üniv Vet Fak Dergi, 2006; 53: 15-23.
- Tobias KM, Johnston SA.** Veterinary Surgery Small Animal. 2-volume set, Elsevier Inc, Saunders, 2012; chapter 44 p.: 1714-1751.
- White DT, Bronson DG, Welch RD.** A Mechanical Comparison of Veterinary Linear External Fixation Systems. Veterinary Surgery, 2003; 32(6): 507-514.
- Yeşilören M.** Kedilerde Karşılaşılan Ekstremitte Uzun Kemiklerinin Kırıklarında Modifiye Eksternal Fiksator Kullanımıyla Sağaltım Sonuçlarının Klinik Ve Radyolojik Değerlendirilmesi. Tezli Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara, 2011.

## Effects of Rubber Flooring on Feeding and Resting Behavior of Dairy Buffalo and Cows

Eyüp Eren GÜLTEPE\*<sup>1</sup>, İbrahim Sadi ÇETİNGÜL<sup>1</sup>, İsmail BAYRAM<sup>1</sup>, E. Hesna KANDIR<sup>2</sup>, Beytullah KENAR<sup>3</sup>, Tuba BÜLBÜL<sup>1</sup>, Cangir UYARLAR<sup>1</sup>, Ümit ÖZÇINAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Wildlife and Ecology, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

<sup>3</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

### ABSTRACT

This experiment evaluated the effects of rubber laying surface on feeding and lying behavior kinetics of dairy buffaloes and cows. Fifty-four Anatolian dairy buffalo (*Bubalus bubalis*) and 18 Brown Swiss dairy cows were used in the experiment. The animals group-housed in pens with concrete floor before the rubber flooring. The behavior of the animals was recorded 24 hours for 15 days before and after rubber flooring with a video camera system in the barn. Behavior data were expressed as % of observed animal in pen per hour for each species. Lying down behavior was assumed in a resting manner. The average number of buffaloes laying down increased after rubber flooring while there was no effect on resting behavior of the cows. The rubber flooring had no effect on feeding behavior of cows. Unexpectedly, the percent of buffaloes displaying feeding behavior decreased after rubber flooring. Results suggested that water buffalo may have different responses to management and housing strategies compared with the cows. However, further comparative studies with individual animal data and wide-spread behavioral observations may support a better understanding of behavioral response to modern intensive management strategies in dairy buffaloes.

**Keywords:** Lying behavior; bedding; cow comfort, loose-housing, water buffalo

\*\*\*

### Sünger Altlık Uygulamasının Sütçü Mandalar ve İneklerde Beslenme ve Dinlenme Davranışları Üzerine Etkileri

#### ÖZ

Bu çalışmada, sünger yataklık uygulamasının sütçü mandalar ve süt ineklerinde beslenme ile yatma davranışı üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada 44 baş sütçü Anadolu manda melezi (*Bubalus bubalis*) ve 18 baş İsviçre Esmeri süt ineği kullanılmıştır. Sünger altlık uygulamasından önce tüm hayvanlar beton zeminde grup halinde serbest biçimde barındırılmıştır. Hayvanların davranışları, sünger uygulamasının 15 gün önce ve sonrasında çiftlikte bulunan kapalı devre kamera sistemi ile 24 saat kaydedilmiştir. Davranış verileri, her bir hayvan türü için her bir padokta % /saat olarak ifade edilmiştir. Tüm yatma davranış şekilleri, dinlenme davranışı olarak kabul edilmiştir. Sünger altlık uygulaması sonrasında; mandalarda yatan hayvan sayısında artış görülürken, ineklerde dinlenme davranışına altlık uygulamasının bir etkisi olmamıştır. Beklenmedik şekilde, altlık uygulamasının ardından beslenme davranışı gösteren ortalama manda sayısında düşüş görülmüştür. Elde edilen veriler, mandaların yönetim stratejileri ve barınma konusundaki değişikliklere ineklerden daha farklı tepkiler verebileceğini göstermiştir. Ancak bireysel hayvan verilerini içeren ve daha geniş çaplı davranış gözlemlerinin olduğu çalışmalar, sütçü mandaların modern entansif yönetim stratejilerine nasıl tepkiler oluşturabileceğinin anlaşılmasına yardımcı olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Yatma davranışı, altlık, inek konforu, serbest sistem barındırma, manda

To cite this article: Gültepe E.E. Çetingül İ.S. Bayram İ. Kandir E.H. Kenar B. Bülbül T. Uyarlar C. Özçınar Ü. Effects of Rubber Flooring on Feeding and Resting Behavior of Dairy Buffalo and Cows. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4):378-383.

Submission: 27.06.2019 Accepted: 17.09.2019 Published Online: 09.10.2019

ORCID ID; EEG: 0000-0002-2404-1232, İSÇ: 0000-0002-7608-6176, İB: 0000-0002-9993-7092,

BK: 0000-0001-6573-680X, CU: 0000-0002-7803-2454, ÜÖ: 0000-0002-1143-1215

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

## INTRODUCTION

Resting behavior (lying down) is very important for dairy cow productivity and a dairy cow spend about half of the day in the resting position (Krohn and Munksgaard 1993). Blood flow in mammary gland increases during lying down position in dairy cows (Rulquin and Caudal 1992). Evidence suggests that poor management practices that cause uncomfortable resting behaviors decrease milk production, growth hormone production and increase risk of lameness (Munksgaard and Lovendahl 1993, Fisher et al. 2002). High production dairy cows tend to rest immediately after feeding behavior due to the unique nature of rumination (Jensen et al. 2005). Duration of resting behavior in dairy cows depends on many factors, such as age, fever and diseases, housing conditions, amount and type of flooring material, excessive herd density (Krohn and Munksgaard 1993). Haley et al. (2000) reported that dairy cows housed with rubber flooring laid down more than cows housed with concrete floor during the day. Eicher et al. (2013) reported higher production for cows on rubber floor than the cows on concrete floor. Furthermore, the authors reported long-term chronic inflammation indicators in the cows housed with concrete floor compared with those housed on rubber. The evidence of the latter study suggests that improved productivity with rubber flooring may be a result of alleviating chronic inflammation, which is common in dairy cows due to high production and excessive intensive nutrition.

The water buffalo (*Bubalis bubalis*) has become an important actor in the global dairy industry, second only to dairy cattle in the value of dairy products produced (Sindhu and Arora 2011). According to FAO (2019) big data, there was a 118% rise in production of whole buffalo milk while a 42% rise in cow milk production from 1994 to 2016. This major change indicates an increasing trend in buffalo milk and buffalo milk products. As a result of commercial interest, buffalo nutrition has shifted from extensive conditions with wide pasture areas and water sources which allow some species-specific natural behavior such as wallowing to intensive conditions which has specific challenges on comfort and welfare of buffaloes such as fewer space allowance than dairy cow standards (De Rosa et al. 2009). Tripaldi et al. (2004) observed that buffalo cows housed intensive conditions without grazing and wallowing opportunities had higher plasma cortisol levels than the buffalo cows housed outdoor yard with free access potholes. In free-stall barn conditions, De Rosa et al. (2009) reported higher milk production for buffaloes had an ample outdoor lot than the buffaloes had no outdoor access. Grasso et al. (1999) concluded that the productivity of buffaloes affects more deleterious than the cows in the same poor housing conditions. Although the abundant research

data are available about the feeding behavior of dairy cows (Neave et al. 2018), research data is limited for feeding behavior of buffalo cows housed in intensive conditions.

Therefore, the objective of this study was to compare the effect of rubber flooring or concrete flooring on feeding and resting behavior of dairy buffaloes and cows. Our secondary objective was to provide comparative data about dairy buffaloes and dairy cows housed with intensive conditions in a similar environment.

## MATERIALS and METHODS

### Animals and housing

The experiment was conducted with 54 Anatolian dairy buffalo and 18 Brown Swiss dairy cows from November to December 2015 in Afyon Kocatepe University Animal Teaching & Research Center (Afyonkarahisar, Turkey, 38°41'52.6"N 30°40'01.1"E). The barn was arranged as a 2-row barn with drive-through feed lane. The animals group-housed in pens with concrete floor. Due to potential challenges for interspecies hierarchy, buffalo and cows did not keep in same pens. All pens had 22.5 m width and 21 m length. All pens had an outdoor stall with soil floor and had a higher bedding area than floor in the middle without stalls. The bedding area allowed head-to-head (face) bedding position for two cows at the same time with 5.6 m length. All pens had automatic manure scraper systems and swinging cow brush for grooming. All areas had a concrete floor except for bedding area and outdoor stalls. After pre-treatment recording, the bedding area was covered with a specific rubber bedding material (3.7 cm thickness, ISBIR Ranchbed®, Isbir Sunger Co., Ankara, Turkey). During the study, the animals were milked twice daily, had ad libitum access to water, fed by standard operating protocol for the Afyon Kocatepe University Teaching and Research Unit, which is a lactation diet based on NRC (2001) requirements. The diets were provided one time a day at 0800 h as a total mixed ration (TMR).

### Behavior data recording

The behavior of the animals was recorded 24 hours for 15 days before and after rubber flooring with a video camera system in the barn (IP Box Type 1 / 2.8" progressive scan, LG Electronics, Seoul, South Korea). Behavior data were expressed as a percent of animal fed or lying down in the stall per hour for each species. Lying down behavior was assumed in a resting manner. In the records, a cow did a 'head-down' position in feed bunk, it assumed feeding behavior. The animal numbers and time duration of records were assumed reliable according to Ito et al. (2009) who concluded that 3 d of continuous data from 30 head cow per commercial dairy farm can

provide reliable data analysis of dairy cow behavior.

### Statistical analysis

Data analysis was performed with MedCalc software (version 16.4.3, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium). Normal distribution of the data was checked by Kolmogorov-Smirnov normality test and some data were log-transformed. Independent sample t-test was used interspecies comparisons. Paired sample t-test was used to evaluating the treatment effect of each species. Significance level was assumed  $P < 0.05$  for all data. Hourly averages of behavior data were provided as a descriptive purpose.

All data were expressed as  $\bar{X} \pm SEM$ .

## RESULTS and DISCUSSION

Descriptive hourly feeding and resting behavior means are shown in Fig. 1 and Fig. 2. In the pre-treatment period, the highest percentage of feeding behavior was observed at 14<sup>th</sup> hour of the day in buffalo and at 10<sup>th</sup> hour of the day in cows (69.0% *vs.* 69.2% of total animal/pen, respectively). The lowest percentage of feeding behavior was recorded at 4<sup>th</sup> hour of day in buffalo (1% of total animal/pen). No cow observed in feeding behavior between 4<sup>th</sup>-6<sup>th</sup> hours of day in cow (0% of total animal/pen). After rubber flooring, highest percentage of feeding behavior was observed at 11<sup>th</sup> hour of the day in buffalo and cows (51.3% *vs.* 70.0% of total animal/pen, respectively). No animal showed feeding behavior between 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> hours of day in cow (0% of total animal/pen). However, lowest percentage of feeding behavior was observed at 4<sup>th</sup> hour of day in buffalo (0.34% of total animal/pen).

Before the rubber flooring, highest percentage of resting behavior was observed at 1<sup>st</sup> hour of the day in buffalo and between 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> hour of the day in cows (39.0% *vs.* 70.7% of total animal/pen, respectively). No animal was observed in resting behavior between 9<sup>th</sup>-15<sup>th</sup> hours of day in buffalo and 10<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> hours of day in cow (0% of total animal/pen). After rubber flooring, highest percentage of resting behavior was observed at 5<sup>th</sup> hour of the day in buffalo and the cows (50.3% *vs.* 67.5% of total animal/pen, respectively). No animal was observed in resting behavior between 9<sup>th</sup>-12<sup>th</sup> hours of day in cow and 10<sup>th</sup>-12<sup>th</sup> hours of day in buffalo after rubber flooring (0% of total animal/pen).

Odyuo et al. (1995) reported eating, ruminating, idling, walking and sleeping behavior data of dairy buffaloes and they concluded that resting behaviors in buffaloes mostly recorded from midnight to earlier morning in the day. These findings are in agreement with our resting behavior data. The resting behavior of buffaloes slightly prolonged until morning feed

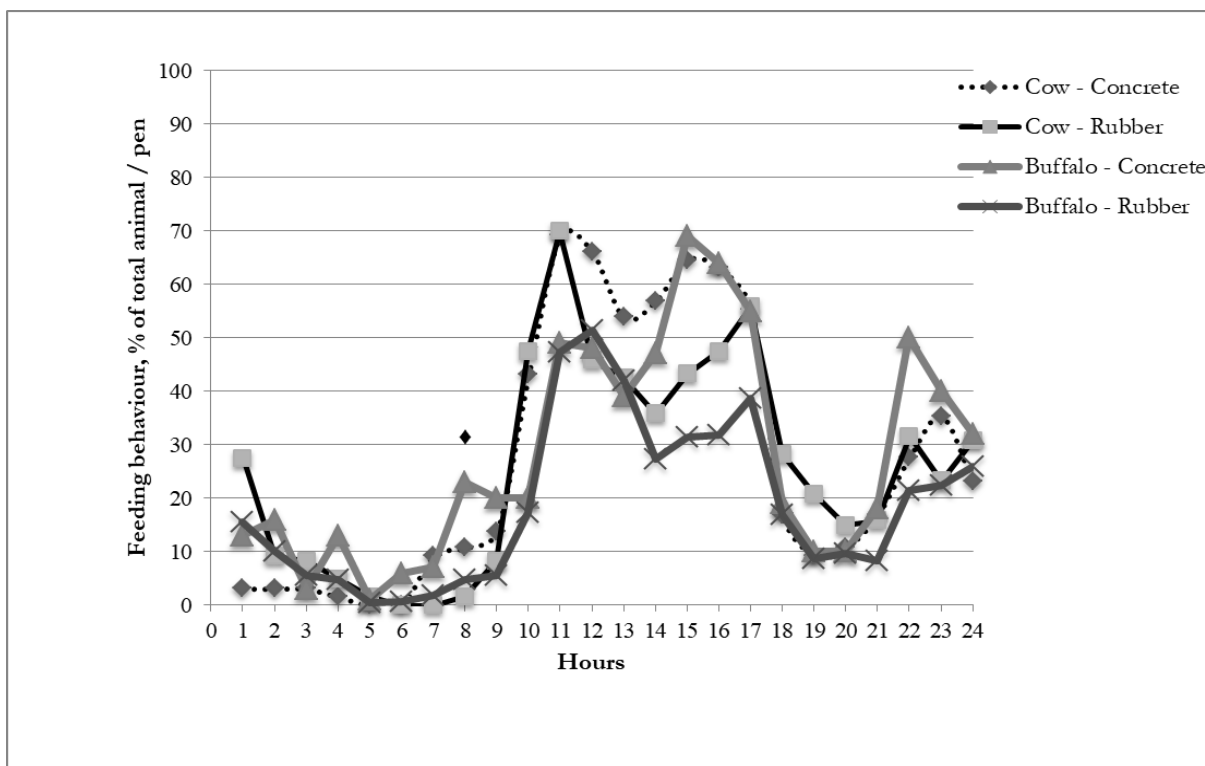
delivery time (0800h) after rubber flooring. Furthermore, resting buffaloes was recorded around noon hours after rubber flooring although there was no resting buffalo record at noon before the rubbering. The average number of buffaloes laying down increased after rubber flooring ( $P=0.046$ ) while there was no effect on resting behavior of the cows. Rushen et al. (2007), who concluded that dairy cows on rubber floor spend more time resting (lying) than the cows on concrete during the day. Inconsistency between results of Rushen et al. (2007) and our findings may be explained by housing conditions. Although Rushen et al. (2007) observed the cows in the tie-stall barn housing system, there were no cubicles or stall in our study. However, de Arcipreste et al. (2018) observed plasticity (changes in behavioral patterns in relation to the environment) and consistency (similar behavioral responses in different situations) of heifers with different cubicle availability in pen. The authors observed consistency in lying behaviors as a response again to different housing conditions. Our findings on cows are in agreement with results of de Arcipreste et al. (2018). Although there was no flooring effect on resting behavior of cows, increased daily means of percents of lying buffalo through the soft flooring suggest that buffaloes are able to use more behavioral plasticity in response to rubber flooring than the cows. Our hypothesis about the buffalo can be supported by findings Salzano et al. (2019), who reported that milk of buffaloes which has 5 m<sup>2</sup> more space allowance per head in pens provided greater antioxidant activity than the milk of buffaloes which has less space per head in pens.

In our study, rubber flooring had no effect on feeding behavior of cows in agreement with observations of Fregonesi et al. (2004), who concluded that rubber flooring did not affect time spent eating in dairy cows although animals spent more time for standing on rubber without eating than concrete floors. However, Tucker et al. (2006) reported that softer flooring caused greater total eating time in dairy cows than concrete floor. Tucker et al. (2006) observed the behavior data individually while Fregonesi et al. (2004) observed group-housed cows which are similar to our large pens. The variety of results may be explained by different housing conditions among the studies. Tucker et al. (2006) concluded that the main treatment effects on behavioral records can be masked by specific challenges of group housing, such as social dominance or copying of behavior (imitation).

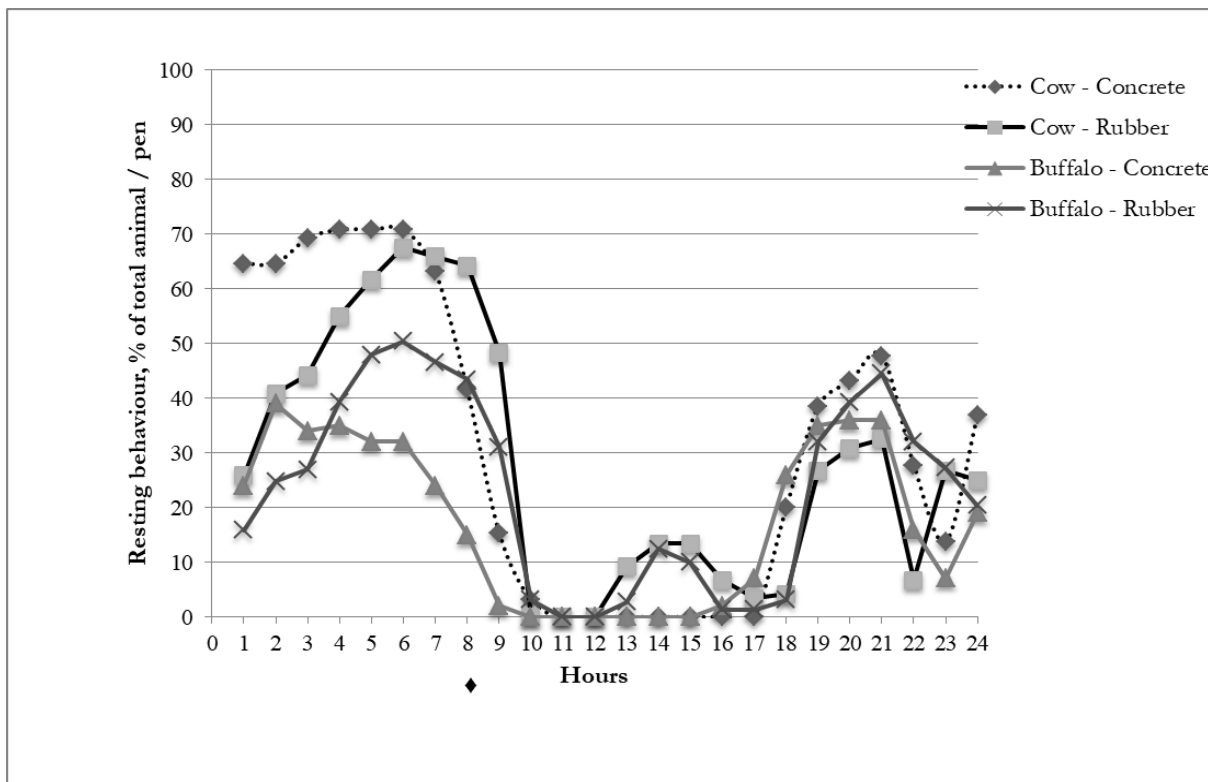
In our knowledge, this is the first report on the effects of rubber flooring in dairy buffaloes in loose-housing conditions. Although there is limited data available, some studies showed that buffaloes may have a different response to intensive conditions than the cow (Napolitano et al., 2013). Even little efforts in

management strategies, such as a shower or extended access to roughage, can positively affect of buffalo production (Thomas et al., 2005). Unexpectedly, however, the percent of buffaloes displaying feeding behavior decreased after rubber flooring. As a

limitation of the study, individual data of animal or spent time eating data was not available. Therefore, the more tendency of buffaloes for rubber flooring to standing, idling or lying down than concrete may be decreased percent of the animal near the feed bunk.



**Fig. 1** Effect of rubber flooring on feeding behaviour of dairy buffalo and dairy cows. The mark (♦) indicates daily feed offering hour (0800 h).



**Fig. 2** Effect of rubber flooring on resting behaviour of dairy buffalo and dairy cows. The mark (♦) indicates daily feed offering hour (0800 h).



**Table 1.** Effects of rubber flooring on feeding and resting behavior of dairy buffalo and cows (Means  $\pm$  SEM)

Item	Cow	SEM	Buffalo	SEM	P values
Resting, %					
Pre-treatment	31.73	5.76	17.54	3.06	0.004
Post-treatment	27.99	4.71	23.16	3.60	0.419
<i>P-values</i>	0.280		0.046		
Feeding, %					
Pre-treatment	27.37	5.06	28.00	4.15	0.349
Post-treatment	25.66	4.04	18.71	3.12	0.221
<i>P-values</i>	0.470		0.001		

All values are expressed as % of observed animal in pen per hour.

## CONCLUSIONS

Results suggested that water buffalo may have different responses to management and housing strategies compared with the cows. However, further comparative studies with individual animal data and wide-spread behavioral observations (such as idling, active sleeping, ruminating, stepping and walking) may support a better understanding of behavioral response to modern intensive management strategies in dairy buffaloes.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the staff of Afyon Kocatepe University Animal Teaching & Research Center (Afyonkarahisar, Turkey) for their assistance with this study. The study was totally funded by Afyon Kocatepe University Scientific Research Projects Commission (Project No. 13.VF.ALTY.01). The results were partially presented in ICVAS 2016. Afyon Kocatepe University Animal Care and Use Committee decided that this study did not require the approval of the ethics committee (Case No.49533702/100).

## REFERENCES

- De Arcipreste, Mancera KF, Miguel-Pacheco GG, Galindo, F. Plasticity and consistency of lying and ruminating behaviors of heifers exposed to different cubicle availability: A glance at individuality. *Appl Anim Behav Sci.* 2018; 205:1-7. DOI: 10.1016/j.applanim.2018.05.020
- De Rosa G, Grasso F, Braghieri A, Bilancione A, Di Francia A, Napolitano F. Behavior and milk production of buffalo cows as affected by housing system. *J Dairy Sci.* 2009; 92(3):907-912. DOI: 10.3168/jds.2008-1157
- Eicher SD, Lay DC Jr, Arthington JD, Schutz MM. Effects of rubber flooring during the first 2 lactations on production, locomotion, hoof health, immune functions, and stress. *J Dairy Sci.* 2013; 96(6):3639-3651. DOI: 10.3168/jds.2012-6049
- FAO. Livestock and production database. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>; Access Date: 20.05.2019.
- Fisher AD, Verkerk GA, Morrow CJ, Matthews LR. The effects of feed restriction and lying deprivation on pituitary-adrenal axis regulation in lactating cows. *Livest Prod Sci.* 2002; 73(2-3):255-263. DOI: 10.1016/S0301-6226(01)00246-9
- Fregonesi JA, Tucker CB, Weary DM, Flower FC, Vittie T. Effect of rubber flooring in front of the feed bunk on the time budgets of dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2004; 87(5):1203-1207. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73270-1
- Grasso F, Napolitano F, de Rosa G, Quarantelli T, Serpe L, Bordi A. Effect of pen size on behavioral, endocrine, and immune responses of water buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *J Anim Sci.* 1999; 77(8):2039-2046. DOI: 10.2527/1999.7782039x
- Haley DB, Rushen J, de Passille AM. Behavioural indicators of cow comfort: activity and resting behaviour of dairy cows in two types of housing. *Can J Anim Sci.* 2000; 80(2):257-263. DOI: 10.4141/A99-084
- Ito K, Weary DM, von Keyserlingk MA. Lying behavior: Assessing within- and between-herd variation in free-stall-housed dairy cows. *J Dairy Sci.* 2009; 92:4412-4420. DOI: 10.3168/jds.2009-2235
- Jensen MB, Pedersen LJ, Munksgaard L. The effect of reward duration on demand functions of rest in dairy heifers and lying requirements as measured by demand functions. *Appl Anim Behav Sci.* 2005; 90(3-4):207-217. DOI: 10.1016/j.applanim.2004.08.006
- Krohn CC, Munksgaard L. Behaviour of dairy cows kept in extensive (loose housing/pasture) or intensive (tie-stall) environments. II. Lying and lying-down behaviour. *Appl Anim Behav Sci.* 1993; 37(1): 1-6. DOI: 10.1016/0168-1591(93)90066-X
- Munksgaard L, Lovendahl P. Effects of social and physical stressors on growth hormone levels in dairy cows. *Can J Anim Sci.* 1993; 73(4):847-853. DOI: 10.4141/cjas93-087

- Napolitano F, Pacelli C, Grasso F, Braghieri A, de Rosa G.** The behaviour and welfare of buffaloes (*Bubalus bubalis*) in modern dairy enterprises. *Animal*. 2013; 7:1704-1713. DOI: 10.1017/S1751731113001109
- Neave HW, Weary DM, von Keyserlingk MAG.** Review: Individual variability in feeding behaviour of domesticated ruminants. *Animal*. 2018; 12:s419-s430. DOI: 10.1017/S1751731118001325
- NRC.** Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7<sup>th</sup> rev. ed., The National Academic Press, Washington DC, USA. 2001.
- Odyuo LT, Jana DN, Das N.** Maintenance behaviour of Murrah buffalo under an intensive management system. *Appl Anim Behav Sci*. 1995; 45:293-299. DOI: 10.1016/0168-1591(95)00573-B
- Rulquin H, Caudal JP.** Effects of lying or standing on mammary blood flow and heart rate in dairy cows. *Ann Zootech*. 1992; 41(1):101.
- Rushen J, Haley D, De Passille AM.** Effect of softer flooring in tie stalls on resting behavior and leg injuries of lactating cows. *J Dairy Sci*. 2007; 90:3647-3651. DOI: 10.3168/jds.2006-463
- Salzano A, Licitra F, D'Onofrio N, Balestrieri ML, Limone A, Campanile G, D'Occhio MJ, Neglia G.** Space allocation in intensive Mediterranean buffalo production influences the profile of functional biomolecules in milk and dairy products. *J Dairy Sci*. 2019; In Press. DOI: 10.1016/0168-1591(95)00573-B.
- Sindhu JS, Arora S.** Buffalo Milk, In: Encyclopedia of Dairy Sciences, Ed; Fuquay JW, 2<sup>nd</sup> Ed., Elsevier Academic Press, MA, USA. 2011; pp. 503-511.
- Thomas CS, Nordstrom J, Svennersten-Sjaunja K, Wiktorsson H.** Maintenance and milking behaviours of Murrah buffaloes during two feeding regimes. *Appl Anim Behav Sci*. 2005; 91:261-276. DOI: 10.1016/j.applanim.2004.11.002
- Tripaldi C, De Rosa G, Grasso F, Terzano GM, Napolitano F.** Housing system and welfare of buffalo (*Bubalus bubalis*) cows. *Anim Sci*. 2004; 78(3):477-483. DOI: 10.1017/S1357729800058872
- Tucker CB, Weary DM, de Pasille AM, Campbell B, Rushen J.** Flooring in front of the feed bunk affects feeding behavior and use of freestalls by dairy cows. *J Dairy Sci*. 2006; 89: 2065-2071. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72274-3

## Antibiotic Resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains Isolated from Horses

Uçkun Sait UÇAN<sup>1\*</sup>, Bilal Osamah MOHAMMED<sup>1</sup>, Murat YİĞİT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Selçuk University, Veterinary Faculty, Microbiology Department, Konya, Turkey

<sup>2</sup>Vocational School of Nafi & Ümit Çeri, Program for Horse Riding & Coaching, Daday, Kastamonu, Turkey

### ABSTRACT

*Stenotrophomonas maltophilia* is a member of gamma proteobacteria that has been frequently isolated from humans as well as from animals. One of the most outstanding feature of *S. maltophilia* is its antibacterial resistance that is basically controlled by various pathways including intrinsic manner. By this study we aimed to evaluate the interaction of *S. maltophilia* suspected equine strains with various antibiotics in the presence of Thymoquinone *in vitro*. Disc diffusion technique was used for measuring interactions between the thymoquinone and others. No measurable inhibition zone for synergistic or antagonistic effect between the thymoquinone and test antibiotics was observed. However, the thymoquinone itself has an antibacterial potential.

**Keywords:** Antibiotic, horse, resistance, *Stenotrophomonas maltophilia*

\*\*\*

### Atlardan İzole Edilen *Stenotrophomonas maltophilia* Suşlarının Antibiyotik Direnci

### ÖZ

*Stenotrophomonas maltophilia* gamma proteobacteria içerisinde yer alan ve hem insanlardan hem de hayvanlardan sık izole edilen bir bakteri türüdür. *S. maltophilia*'nin en dikkat çeken özelliklerinden birisi bakterinin intrinsik mekanizmalar da dahil olmak üzere çeşitli şekillerde geliştirdiği yüksek antibiyotik direncidir. Bu çalışma ile atlardan izole edilmiş olan *S. maltophilia*'nın timokionon ile çeşitli antibiyotiklerin beraber kullanıldıklarındaki etkileşimini ölçmek amaçlandı. Ne sinerjizm ne de antogonizm şeklinde bir etkileşim ölçülmedi. Ancak timokiononun *S. maltophilia* suşları üzerinde antibakteriyel etkisi tespit edildi..

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik, at, direnç, *Stenotrophomonas maltophilia*

---

To cite this article: Uçan U.S Mobammed B.O. Yiğit M. Antibiotic Resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains Isolated from Horses. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4):384-388.

Submission: 27.06.2019

Accepted: 12.09.2019

Published Online: 09.10.2019

**ORCID ID;** USU: 0000-0002-2677-179X, BOM: 0000-0001-6485-9066, MY: 0000-0002-2193-5310

\*Corresponding author e-mail: usucan@selcuk.edu.tr

---

## GİRİŞ

According to Bergey's manual system of bacteriological classification the genus *Stenotrophomonas* is a member of 11 genera that belong to the Xanthomonadaceae family which belongs to the bacterial class Gammaproteobacteria (Saddler and Bradbury 2005). *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*), formerly called *Pseudomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia*, is a nonparasitic, nonfermentative, Gram-negative rod shaped bacteria found in habitats of aquatic, soil and plant environments (Denton and Kerr 1998).

The importance of the bacteria *S. maltophilia* is significantly increasing after it has been frequently isolated from humans after causing opportunistic nosocomial infections and more frequently from animals what made it also considered important in veterinary medicine (Çelikel 2012). The isolation of *S. maltophilia* from cases of lymphadenitis in goats (Johnson et al. 2003), arthritis in dogs (Muir et al. 2007) and mastitis in cows (Ohnishi et al. 2012), and also in special cases from the lower tracheal region of horses with chronic cough (Winther et al. 2010) has been reported.

The non-fermentative gram negative bacilli *S. maltophilia* are 0.5-1.5 µm in length straight or curved non-capsuled motile rods that do not form spores. It is a catalase positive obligated aerobic bacterium that grows well in an optimal temperature of 35 °C. It does not show growth in temperatures above 41 °C or lower than 4 °C. The S-type colonies formed by this bacteria are usually pale yellowish White (Denton and Kerr 1998). Many strains of the *S. maltophilia* showed intrinsic resistance to a variety of wide spectrum antibiotics. This resistance was due to the permeability reduction in the outer cell wall and also by the aminoglycoside modifying enzymes. It has also been reported that resistance to quinolones, tetracycline and chloramphenicol occurs by overexpression of cryptic efflux pumps. *S. maltophilia* strains showed low susceptibility to erythromycin, while the susceptibility to trimethoprim-sulfamethoxazole, minocycline and ticarcillin / clavulanate was the highest in most of the studies (Ohnishi et al. 2012, Sanchez 2015).

On the other hand, the use of antibiotics and antibacterial chemotherapeutics is becoming increasingly limited in both veterinary and human medicine. The reasons for this limitation are; the ability of bacteria to immediately develop and exhibit resistance after the administration of antibiotics and also the presence of side effects in most of the antibiotics. There is an urgent need for discovering new drugs or chemotherapeutic agents that induce less resistance and with lower toxicity (Halawani 2009). In this context, the potential aspect of various herbal extracts has been the subject of many studies. In Turkey there is a well-known folkloric plant with a high potential of being useful for the development of

new antimicrobials. The plant *Nigella sativa* (*N. sativa*) that is produced and consumed in large quantities in Turkey demonstrated both biological and antibacterial effects. These effects are found in the core material contained inside this plant, the Thymoquinone (Halawani 2009, Uçan et al. 2018, Yimer et al. 2019). The Thymoquinone attracted the attention after showing an undeniable affectivity when it was administered along with some antibiotics. It showed a synergetic effect with some antibiotics when it is used against *Staphylococcus aureus* and it also showed synergetic, antagonistic and some have been reported to have an additive effect when it was used with the same antibiotics against some Gram-negative bacteria (Halawani 2009).

The resistance of *S. maltophilia* strains which has been isolated from various cases in veterinary medicine to many antibiotics by various pathways, including intrinsic mechanisms, appears to be an important potential problem in treatment processes. The aim of this study was to evaluate the interaction of *S. maltophilia* suspected equine strains with various antibiotics in the presence of thymoquinone *in vitro*.

## MATERYAL ve METOT

Twenty *Pseudomonas/ Stenotrophomonas* suspected equine isolates from the culture collections in the Department of Microbiology of the Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University were used. The biochemical identification of the isolates was accomplished by testing the following characteristics: colony morphology, growth on Mc Conkey Agar, Gram staining, motility, oxygen requirement, hemolysis on blood agar, catalase and oxidase activity, DNase, lysine decarboxylase, urease, H<sub>2</sub>S production and the fermentation of lactose, sorbitol and mannitol. Twelve of the isolates were also identified as *S. maltophilia* using the vitek automated identification system (Vitek biomerieux, Konya Veterinary Control Institute). This was considered a confirmation of the previously obtained results from the biochemical testing.

### The measurement of antibiotic-thymocionone interaction

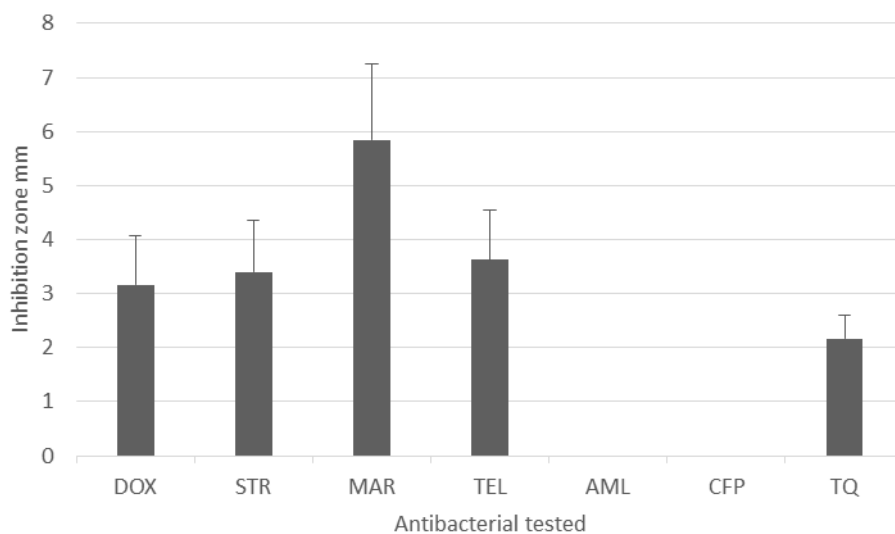
Some of the commercially available antibiotics that are used for horses' treatment were tested in this study. The antibiotic discs of Doxycycline (10µg; Bioanalyse), Streptomycin (25µg; Bioanalyse), Marboflaxacin (5 µg; Bioanalyse), Telithromycin (15 µg; Oxoid), Amoxycillin (10µg; Oxoid) and Cefaperazone (75Oxg; Oxoid) were used. Thymoquinone (Santa Cruz Biotechnology, sc-215986) was diluted in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMSO; Sigma-Aldrich, D8418) at a concentration of 100 mg/mL and the stock solution was stored at + 4°C in tubes wrapped in aluminum paper.

Firstly, the stock solution of thymoquinone was further diluted to 60 mg/ml using sterile distilled water and 10 µl of this was impregnated on sterile paper discs of 6 mm diameter. Twenty isolates were first tested for their susceptibility to thymoquinone on Mueller Hinton Agar (Merck, 105437). Then, as previously mentioned by Halawani (2009), the isolates were cultured on Mueller Hinton Agar (Merck, 105437) and then the antibiotic discs were placed around the disc impregnated with thymoquinone in the center. Suitable distance to the center was kept in order to allow any interaction between the thymoquinone and the antibiotics. The detection and measurement of the inhibition zones were done after 24 hours of incubation in an aerobic humid environment. The test was repeated three times.

## RESULTS

According to bacterial phenotype and biochemical tests results, all strains were non motile Gram negative rods, grew under aerobic conditions, colony morphology was transparent-white, catalase, DNase, lysine decarboxylase gave positive results while H<sub>2</sub>S, urease were negative, non-reactive to sugars (lactose, sorbitol, mannitol) and only 2 isolates were alpha hemolytic while the remaining 18 strains were identified as non-hemolytic. 12 of these strains (including alpha hemolytic ones) were tested with Vitek automated system and all were identified as *S. maltophilia* (8645 vitek result code).

All 20 isolates were susceptible to thymoquinone and fully resistant to Cefaperazone and Amoxycillin (Table 1 and Figure 1). No measurable zone of synergistic or antagonistic effects between thymoquinone and test antibiotics was seen around any of the used discs.



Şekil 1. *S. maltophilia* Suşlarının Antibakteriyel Duyarlılıkları.

Figure 1. Antibacterial Susceptibilities of *S. maltophilia* Strains.

DOX: Doxycycline (10 µg), STR: Streptomycin (25 µg), MAR: Marboflaxacin (5 µg), TEL: Telithromycin (15 µg), AML: Amoxycillin (10 µg), CFP: Cefaperazone (75 µg), TQ: Thymoquinone (0.6 mg)

Tablo 2. Antibiyotikler ve *S. maltophilia* Suşlarının Duyarlılıkları (Aritmetik Ortalama ± Standart Sapma)

Table 2. Antibiotics and susceptibilities of *S. maltophilia* strains (mean ± SD)

Antibacterial	Inhibition zone (mm)
DOX	3.16 ± 0.91
STR	3.4 ± 0.96
MAR	5.85 ± 1.39
TEL	3.63 ± 0.92
AML	0
CFP	0
TQ	2.17 ± 0.42

DOX: Doxycycline (10 µg), STR: Streptomycin (25 µg), MAR: Marboflaxacin (5 µg), TEL: Telithromycin (15 µg), AML: Amoxycillin (10 µg), CFP: Cefaperazone (75 µg), TQ: Thymoquinone (0.6 mg)

## DISCUSSION

Despite previous consideration with over the last two decades, *S. maltophilia* is now accepted as a causative bacterium of serious opportunistic infections (Looney et al. 2009, Winther et al. 2010, Adegoke et al. 2017).

In this study, all suspected strains of *S. maltophilia* were found non motile at 37 °C. In a previous study conducted long ago, Denton and Kerr (1998) tested the motility of *S. maltophilia* strains and reported that they considered it variable at 37 °C and also reported that the rate of motile strains was 16-85%. As we can see from the results obtained from our study, the 20 isolates in this study were non motile which did not comply with the above variability in terms of motility in the previous study.

In terms of oxidase activity evaluation, Palleroni reported a typical oxidase reaction as negative for this species some ago (Palleroni 2005). In our study, when oxidase enzyme activity was evaluated, none of the isolates gave a clear positive or negative result that can be considered reliable. Denton and Kerr (1998)'s study did not rely on this test for the identification of the *S. maltophilia* strains and apparently believed that it was problematic. On the other hand, another study by Adegoke et al. (2017) confirmed the variability of the oxidase activity in various strains of this species.

The hemolysis was also one of the observed phenotypic properties in this study. Only 2 of the 20 strains showed some hemolytic activity. This was the second phenotypic feature that was not included in the tests to be used in *S. maltophilia* identification proposed by Denton and Kerr (1998).

*S. maltophilia* is known to intrinsically be resistant to most currently available chemotherapeutics. By means of chromosomal, inducible L1 metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) and L2  $\beta$ -lactamase that *S. maltophilia* possesses (Denton and Kerr 1998) an intrinsic resistance is potentially performed against most  $\beta$ -lactams, including the carbapenem class, with the exception of monobactams and  $\beta$ -lactams (Looney et al. 2009).

The main reason for the limitation of antibiotics use is that after the discovery of a new antibiotic there is a possibility of developing immediate resistance against it at the first time its used in addition to the side effects caused by these antibiotics. For this reason, there is a need for discovering and developing new drugs against which resistance does not develop and with no toxicity or at least with as low toxicity as possible (Halawani 2009). *N. sativa*, which has antimicrobial effect among its various biological effects, owes this potential to various bioactive components it contains (Yimer 2019). This feature of *N. sativa* has been known for many years. In (1991) Hanafi and Hatem reported that *N. sativa* diethyl ether extract showed a synergic effect when it is used with streptomycin, erythromycin, tobramycin, doxycycline, chloramphenicol, nalidixic acid,

ampicillin, lincomycin and co-trimoxazole against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* in their study. A number of studies indicated that *N. sativa* has this antimicrobial effect especially with thymokinone (Hanafi and Hatem 1991, Halawani 2009, Yimer 2019). Some interesting findings showed that thymokinone has an antibacterial effect on variety of Gram negative strains including *Pseudomonas aeruginosa* isolates that are resistant to a large number of antibiotics at the intrinsic level, and also on *Staphylococcus aureus* strains regardless of their resistance to antibiotics (Halawani 2009). Researchers found a synergic effect between the thymokinone and some antibiotics such as ampicillin, cephalexin, chloramphenicol, tetracycline, gentamicin and ciprofloxacin with *Staphylococcus aureus* but they found a different effect in terms of synergism with Gram negative and reported that 28.9% of gram negative isolates had synergism and 23.6% had antagonistic effect. In our study the effect of thymokinone was tested on strains of a single species which is the *S. maltophilia*. It is important to provide different antibacterial options for bacteria with multiple resistance. There are only a limited number of antibiotics that can be used against *S. maltophilia* (Looney et al. 2009, Ohnishi et al. 2012, Adegoke et al. 2017). For this reason, the chemotherapeutic potential posed by thymokinone makes it a good candidate whose effect on *S. maltophilia* has to be studied whereas, in our study thymokinone did not show any kind of synergic or antagonistic interaction with any of the used antibiotics (Table 1 and Figure 1). And therefore the results in our study do not comply with the results obtained from the study of Hanafi and Hatem in 1991 on *Pseudomonas aeruginosa* in terms of the interaction between thymokinone and some of the used antibiotics. *S. maltophilia* was previously included in the same genus as *Pseudomonas*. It is now described under a different genus and thus the genetic differences may include the genetic coding of multiple antibiotic resistance and also in the study of Hanafi and Hatem (1991) many components along with thymokinone were administered together which could have some different effects while in our study thymokinone was used alone and that could be also responsible for the different results obtained in our study.

As a result, the antimicrobial effect of thymokinone was detected only on a limited number of equine *S. maltophilia* strains isolated in different periods and the antibiotics that are clinically used for horses' treatment did not show any interaction of any kind in this study. In spite of that thymokinone is still a material of a natural source that has an attractive antibacterial potential effect to be used as a single substance.



## REFERENCES

- Adegoke AA, Stenström TA, Okoh AI.** *Stenotrophomonas maltophilia* as an emerging ubiquitous pathogen: Looking beyond contemporary antibiotic therapy. *Front Microbiol.* 2017; 8:2276. doi: 10.3389/fmicb.2017.02276.
- Celikel IU.** Isolation and characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* from animals and their environment. PhD thesis, Ankara University Health Science Institute, Ankara, 2012.
- Denton M, Kerr KG.** Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 57-80.
- Halawani E.** Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interactions with some antibiotics. *Adv Biol Res.* 2009; 3(5-6): 148-152.
- Hanafı MS, Hatem ME.** Studies on the anti-microbial activity of the *Nigella sativa* seed (Black Cumin). *J Ethnopharmacol.* 1991; 34: 275-278.
- Johnson EH, Al-Busaidy R, Hameed MS.** An outbreak of lymphadenitis associated with *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* in Omani goats. *J Vet Med.* 2003; 50: 102-104.
- Looney WJ, Narita M, Muhlemann K.** *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2009; 9: 312-323.
- Muir P, Oldenhoff WE, Hudson AP, Manley PA, Schaefer SL, Markel MD, Hao Z.** Detection of DNA from a range of bacterial species in the knee joints of dogs with inflammatory knee arthritis and associated degenerative anterior cruciate ligament rupture. *Microb Pathog.* 2007; 42: 47-55.
- Ohnishi M, Sawada T, Marumo K, Harada K, Hirose K, Shimizu A, Hayashimoto M, Sato R, Uchida N, Kato H.** Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of bovine *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from a mastitis outbreak. *LETT APPL MICROBIOL.* 2012; 54: 572-576.
- Palleroni NJ. Genus IX.** *Stenotrophomonas*, In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two The Proteobacteria, Part B The Gammaproteobacteria.* Ed; Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, 2nd Ed., Springer, Switzerland. 2005; pp. 107-115.
- Saddler GS, Bradburry JF. Family I.** Xanthomonadaceae fam. nov In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two The Proteobacteria, Part B The Gammaproteobacteria.* Ed; Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, 2nd Ed., Springer, Switzerland. 2005; pp. 63.
- Sánchez MB.** Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Microbiol.* 2015. 6: 658. doi: 10.3389/fmicb.2015.00658.
- Ucan US, Sayin Z, Sakmanoglu A, Uslu A.** Effect of thymoquinone on proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells. *Eurasian J Vet Sci.* 2018; 34:1-6.
- Winther L, Andersen RM, Baptiste, KE, Aalbek B, Guardabassi L.** Association of *Stenotrophomonas maltophilia* infection with lower airway disease in the horse: A retrospective case series. *Vet J.* 2010; 186: 358-363.
- Yimer EM, Tuem KB, Karim A, Ur-Rehman N, Anwar F.** Review Article *Nigella sativa* L. (Black Cumin): A

## Physicochemical Characteristics and Antioxidant Capacity of Traditional Yogurt Fortified with Grape (*Vitis vinifera L.*) Seed Extract at Different Levels

Dilek DEMİR BÜKER KAVAK<sup>1</sup>, Bilge AKDENİZ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Engineering Faculty, Food Engineering Department, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar 03200, Turkey

### ABSTRACT

The aim of this study is to obtain the grape seed extract with high antioxidant activity and to investigate the quality characteristics of traditional yogurts fortified with seed extracts at different concentrations. For this aim, batch hot water extraction was conducted and extraction conditions were optimized to produce *Vitis vinifera L.* grape seed extract using with the highest antioxidant activity. The fortification of yogurts was conducted at 0.1-0.15 and 0.2 g/ 100g extract level and antioxidant, physicochemical, microbial and sensory characteristics of the yogurt samples were analyzed. Results showed that antioxidant activity of fortified yogurts were higher and up to 14 % more antioxidant activity was detected compared to the control samples. Yogurt samples preserved their physicochemical characteristics. Although sample with 0.1 g/100 g extract had highest scores in overall acceptance, the sample containing the highest extract concentration of 0.2 g/100 g, exhibited negative perceptions by panelists in sensorial analysis. In conclusion, grape seed may be used in traditional yogurt production by improving the taste and antioxidant potential. The fortification levels of 0.1-0.15 g/100 g grape seed extract might be more feasible in functional yogurt production and might be more recommended for consumer's appreciation in terms of positive health effects.

**Keywords:** Grape Seed, Extraction, Yogurt, Functional Food, Antioxidant

\*\*\*

### Üzüm (*Vitis vinifera L.*) Çekirdeği Ekstraktı ile Zenginleştirilmiş Geleneksel Yoğurdun Fizikokimyasal Özellikleri ve Antioksidan Kapasitesi

#### ÖZ

Bu çalışmanın amacı, antioksidan aktivitesi yüksek üzüm çekirdeği ekstraktı elde etmek ve farklı konsantrasyonlardaki çekirdek ekstraktları ile takviye edilmiş geleneksel yoğurtların kalite özelliklerini araştırılmasıdır. Bu amaçla ilk olarak sıcak su ekstraksiyonu uygulanarak en yüksek antioksidan aktiviteye sahip *Vitis vinifera L.* üzüm çekirdeği ekstraktı üretmek için ekstraksiyon koşulları optimize edilmiştir. Yoğurtların zenginleştirilmesi 0.1 - 0.15 ve 0.2 g/100g ekstrakt düzeyinde yapılmıştır. Yoğurt numunelerinin antioksidan, fizikokimyasal, mikrobiyal ve duyu özellikleri analiz edilmiştir. Sonuçlara göre, zenginleştirilmiş yoğurt numunelerinin antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğunu ve kontrol numunelerine kıyasla % 14'e kadar daha fazla antioksidan aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Yoğurt numunelerinin ise fizikokimyasal özelliklerini korumuştur. Duyusal analizlerde 0.1 g / 100 g ekstrakt içeren örnekler genel kabul görmeye en yüksek puana sahip olmasına rağmen, 0.2 g / 100 g içeren örnekler panelistlerce olumsuz algılanmıştır. Sonuç olarak, üzüm çekirdeği ekstraktı geleneksel yoğurt üretiminde tat ve antioksidan özelliğini arttırmak için kullanılabilir. 0.1-0.15 g / 100 g düzeyinde üzüm çekirdeği ekstraktı ile zenginleştirme, fonksiyonel yoğurt üretiminde makul olmakta ve olumlu sağlık etkileri açısından tüketicilerin beğenisine daha fazla hitap etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Üzüm Çekirdeği, Ekstraksiyon, Yoğurt, Fonksiyonel Gıda, Antioksidan

To cite this article: Demirbükker Kavak D, Akdeniz B. Physicochemical Characteristics and Antioxidant Capacity of Traditional Yogurt Fortified with Grape (*Vitis vinifera L.*) Seed Extract at Different Levels. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4):389-395.

Submission: 25.07.2019 Accepted: 17.09.2019 Published Online: 09.10.2019

ORCID ID; DDK: 0000-0001-5914-3901, BA: 0000-0003-2912-451X

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

## INTRODUCTION

Grape fruit is a rich source of phytochemicals. 60-70 % of the extractable polyphenols of grape tissues exist in the grape seed, 28-35% in the fruit peel and 10% in the fruit meat (Shi et al. 2003, Akdeniz 2010). Among these, the grape seeds with high polyphenol content appear as output material during wine, grape juice and grape molasses production. Grape seed contains polyphenols, vitamins, and minerals, (Ranjitha et al. 2014, So-Young et al. 2006). Due to its high antioxidant properties, it was reported to have protective effects on cells, cardiovascular diseases, also act as antiaging and immune-regulatory agent (Shi et al. 2003, Bagchi et al. 2000, Sato et al. 1999, Saito et al. 1998, Jayaprakash et al. 2001, Mandic et al. 2009). Therefore, grape seed extract is a well-known and popular dietary supplement and especially used in foods to provide functionality. Grape seed extract can be obtained from grape seeds using different extraction techniques. However, the bioactivity of the extracts from plants may vary on the extraction conditions such as temperature, solvent composition and time (Kavak and Akdeniz, 2019, Kavak and Kececi 2019, Kavak 2017). Therefore to obtain a bioactive grape seed extract such as having high antioxidant activity, suitable extraction conditions should be set (So-Young et al. 2006, Jayaprakash et al. 2003).

The word "yogurt" is derived from the Turkish word and it is a traditional food in the Balkans and the Middle East (Tamime and Deeth 1980). Yogurt is a fermented milk product which is formed as a result of the culture activities added to milk. As a nutritional source, it has an important biological value for all age groups (Granato et al. 2010). Fermentation occurs in yogurt with lactic acid bacteria and as a result of fermentation, several metabolites with natural biological activity such as antimicrobials against some pathogenic microorganisms are formed (Con et al. 1996). Due to the competitive activity of microorganisms present in the structure of yogurt and the presence of antimicrobial agents, yogurt has a protective effect against a number of infections causing gastrointestinal and urogenital diseases.

Natural products such as grapes, edible berries were successfully explored in different functional foods due to their considerable bioactivities (Jang et al. 1997, Nile and Park 2014). There are different studies using fruit juices, powders, and extracts to investigate their potential as functional ingredients in the dairy sector (Nguyen and Hwang 2016, Wallaca and Guisti, 2008). Families with children are the core consumers of dairy products such as yogurt and it is essential to explore new potent uses of grape seed dairy sector. Therefore, the aim of this study is to obtain the grape (*Vitis vinifera* L.) seed extract with high antioxidant activity and to investigate the quality characteristics of

traditional yogurts fortified with extracts at different concentrations.

## MATERIALS and METHODS

### Materials

Seeds of grape (*Vitis vinifera* L.) were obtained from local herbalist (Afyonkarahisar, Turkey). 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), NaOH were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich GmbH, Germany). Plate count Agar (PCA) and Violet Red Bile Agar (VRBA) (Merck, Germany) were used for microbiological analysis.

### Obtaining Grape Seed Extracts

To produce grape seed extracts, the seeds were grounded and extracted by hot water extraction process (1:10 w/v; mg seed per mL water). Experimental design for the extraction was shown in Table 1. Aqueous extracts were lyophilized (Lyoquest-Telstar, Japan), sealed in tests tubes and stored under refrigerated conditions (+4 ±1 °C) until usage.

### Production of Yogurt Using Grape Seed Extract

Yogurt is produced in traditional method. Cow milk is pasteurized in a household container at ~ 89±2°C for 5 min. Pasteurized cow milk was cooled to ~44 °C. The plain yogurt was mixed in glass container until it was liquid, and the warm milk was added into the mixture where the weight percentage of plain yogurt in milk was 3 % (w/w). Samples were stirred for ~1 minute for the yogurt to dissolve well into the milk. Samples were stored at stable temperature of 43±1°C in oven for the incubation of culture for 3.5 hours to a pH value of 4.4-4.6. After curd formation samples were cooled to +4 ±1 °C and kept for 1 hour to stabilize the curd structure. Grape seed extracts were added to the samples and completely stirred. Samples were stored at +4°C ±1 for 5 days before the analysis. The codes of the samples were given in Table 2.

### Antioxidant Activity Assays

Antioxidant activity of extracts and yogurt samples were determined by DPPH free radical scavenging assay. 50 µL sample was vortexed with DPPH solution. The mixture was incubated at room temperature for 1h at dark. The absorbance of the samples was measured at 517 nm using UV-Vis Spectrophotometer. The antioxidant activity was expressed in terms of percentage of radical scavenging AA (%):

$$AA(\%) = \frac{(A_c - A_t)}{A_c} \times 100 \quad (1)$$

where  $A_c$  is the absorbance of control (containing all reagents except the test compound) and  $A_t$  is the absorbance of test sample, respectively.

### **Physicochemical Analysis of Yogurt Samples**

Samples stored for 5 days at refrigerated conditions were analyzed for their dry matter, by gravimetric method, acidity by titrating with 0.1 M NaOH (until the faint pink color appeared and stable for 2 minutes) in terms of Soxhlet Henkel:°SH, for pH by diluting sample in a ratio of 1/10 with distilled water using pH meter (Ohaus 3100, USA) (Tekinşen et al. 2002).

### **Microbiological Analysis of Yogurt Samples**

Samples were evaluated for their total mesophilic aerobic bacteria (TMAB) and total coliform bacteria using PCA at 37°C incubation for 72 hours, and VRBA at 35°C for 48 hours incubation under aerobic conditions, respectively (Harrigan and McCance 1976).

### **Sensorial Analysis of Yogurt Samples**

The sensorial characteristics of samples were measured using hedonic test by a total of 12 pre-trained individuals (4 males, 8 females). Yogurt samples of ~40 mL were put in white plastic cups. They served at room temperature with random 3 digit codes in a random order. Water was provided for panelists to rinse their mouth between samples. The evaluation was based on the appearance, taste and color, mouth feel and overall acceptance criteria by scoring on 9 point hedonic scale (Altuğ 1993).

## **RESULTS and DISCUSSION**

### **Antioxidant Activity of Extracts**

To obtain grape seed extract having the highest antioxidant activity, the effect of extraction temperature and time was investigated to optimize the extraction conditions and the results were shown in Figure 1 and 2. Results showed that increase of temperature around from 40 to 55°C caused an increase in antioxidant activity ~ 8 % for 60 minutes hot water extraction (Figure 1).

It was reported that temperature was an important factor in extraction since it is highly effective on diffusion of the molecules (Majd et al. 2014, Kavak and Ülkü 2015, Cacace and Mazza, 2003). But, in extraction processes the temperature should not be so high to avoid degradation of the phenolics compounds thus an upper limit to optimize the bioactivity is critical (Kavak and Akdeniz 2019). The antioxidant activity was nearly same for 45 and 55 °C. Therefore the working temperature for the following extraction process was chosen as 45°C to obtain the grape extracts with the highest antioxidant activity (Figure 2). In the second step, effect of time on AA% was the highest for 90 minutes of extraction. Therefore those results revealed that the optimum extraction process was 45°C for 90 min within the chosen experimental parameter's range and those

extracts with the highest antioxidant activity could be used for further steps to produce functional yogurt.

### **Antioxidant Activity of Yogurt**

To investigate the effect of extract addition on the antioxidant activity, extracts obtained at optimized conditions (having the highest antioxidant activity as previously mentioned) were added to yogurt samples and antioxidant activities of the samples were investigated. Yogurt contains many bioactive components such as casein where it was reported that casein as a major protein constituent of yogurt and had also antioxidant activity (Kavak and Akdeniz 2016, Silva and Malcata 2005). Therefore results in Table 3 indicated a considerable antioxidant activity (around 54%) even in YK samples. The fortification of traditional yogurt with seed extracts (0.2g/100g) increased AA% to 68.5 where this increase in AA% with increase in extract concentration is in good agreement with previous reports (Shyamala et al. 2005). Additionally the antioxidant activity measured at the 5<sup>th</sup> day of storage revealed that activity was preserved in refrigerated conditions indicating the stability of the functional product over time (Dabija et al. 2018).

### **Physicochemical Analysis Results**

The results of physicochemical analysis were shown in Table 4. The total acidity represents the amount of lactic acid produced during fermentation in the yogurt and varied between 36.4 and 38.1 which were in good agreement with the previous reports for the yogurt stored for 5 days at +4 °C (Tomovska et al. 2016). Dry matter contents were almost same for the control and extract added samples which was consistent with the previous reports about the traditional yogurts where 13.3% dry matter was reported. The pH change for the fortification of yogurt is reported to depend on the nature of the added component as well as it was related to the development of the growth of the bacteria in samples (Pelaes et al. 2015). In literature, the addition of hawthorn extract (in 0.5 % concentration) affected the pH and resulted a decrease in yogurt acidity but the addition *Pleurotus ostreatus* aqueous extract did not affect the pH where the pH of the control sample was approximately the same as pH of other samples (Dabija et al. 2018, Pelaes et al. 2015). However, results in Table 3 indicated that the pH values of samples slightly decreased during storage at +4 °C and with the addition of grape seed extracts. The decrease in acidity of yogurt after the production was clear with the extracts added samples compared to the control sample.

### **Microbiological Analysis Results**

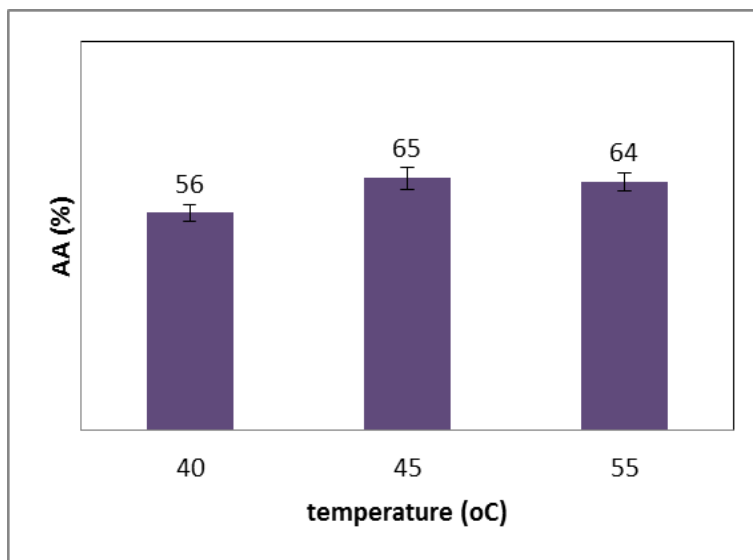
The total coliform bacteria group can be regarded as a large collection of different kinds of bacteria where there is a strong relationship between yogurt safety and quality. Results in Table 5 showed that total

coliform bacteria were under the detection limit of 1 log cfu/g. These results indicated the raw materials quality, adequate heat treatment applications or hygienic production. The total mesophilic aerobic bacteria counts of the samples ranged between 7.29-8.24 log cfu/g. In literature, it was reported that flavor additives had no effect on the mesophilic aerobic count in yogurt (Con et al. 1996). But this study showed that there was a slight decrease in TMAB with fortification of yogurt with grape seed extract.

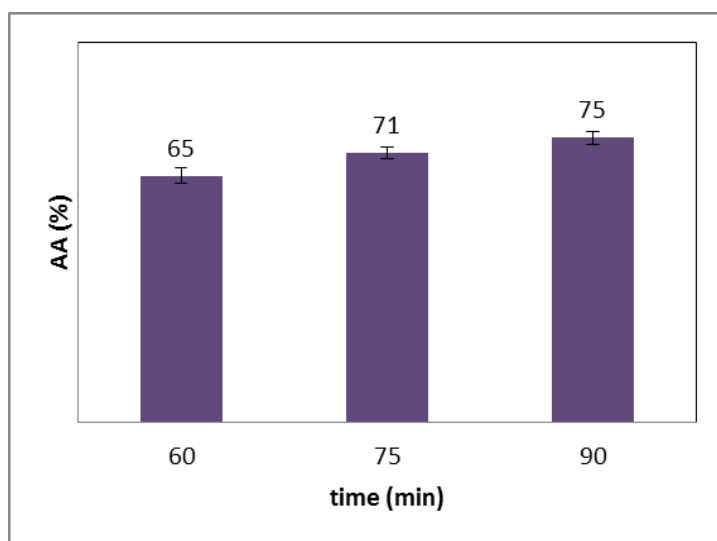
### Sensorial Analysis Results

Figure 3 shows the sensory analysis results of the yogurt samples fortified with grape seed extract in different concentrations. Results showed that fortifying yogurt with grape seed affected the sensory scores of quality attributes. The impact of fortification on color was distinct where Y2 had the highest (8.9) and YK took the lowest score of 7.8.

The grape seed extract has orange-light brown color due to its pigments and this might have positively contributed to yogurt color. Similar results were previously reported in literature (Nguyen and Hwang 2016). Overall acceptance scores indicated that Y1 got the highest score (8.1) where it was 7.6 for YK. Although the addition of extract was more acceptable for all characteristic for Y1 and Y2 compared to control samples, the values of Y3 were the lowest except color. Those results revealed that higher amounts of extract addition were not appreciated. Since the grape seed extract itself usually has astringent taste, higher concentrations (0.2g/100g) might possibly showed negative effects on other sensorial attributes. Therefore addition of 0.1-0.15 g/100 g grape seed extract might be recommended for consumer's appreciation in terms of positive health effects.



**Figure 1.** Effect of extraction temperature on antioxidant activity in terms of radical inhibition (1 g/10 mL extract; extraction time 60 min.)



**Figure 2.** Effect of extraction time on antioxidant activity of extracts (1 g/10 mL extract; extraction temperature 45 °C)

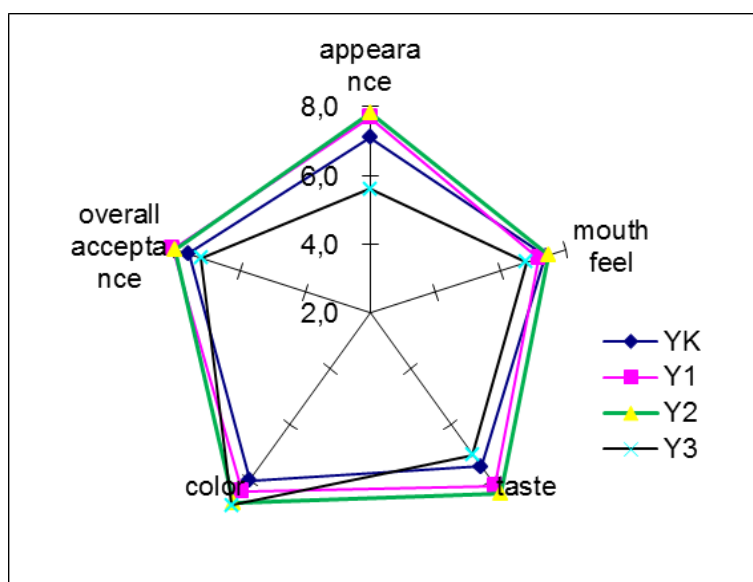


Figure 3. Sensory scores of yogurt samples

Table 1. The parameters of experimental design used for extraction

Temperature (°C)	Time (min)
40	60
45	75
55	90

Table 2. Codes and Definitions of the Samples

Sample Code	Definition
YK	Control sample (with no extract)
Y1	Sample with 0.1g extract/100g yogurt sample
Y2	Sample with 0.15 g extract/100g yogurt sample
Y3	Sample with 0.2 g extract/100g yogurt sample

Table 3. Antioxidant activity of yogurt samples

Samples	AA (%)
YK	54.2±2.3
Y1	58.3±2.2
Y2	63.6±1.8
Y3	68.5±2.1

Table 4. Pysicochemical analysis results of yogurt samples

Samples	Dry Matter (%)	°SH	pH
YK	12.1±0.3	37.2±0.4	4.24±0.04
Y1	12.2±0.7	36.4±0.6	4.16±0.05
Y2	12.1±0.8	37.2±0.8	4.11±0.06
Y3	12.3±0.2	38.1±0.5	4.08±0.03

Table 5. Microbial analysis results of yogurt samples (log cfu/g)

Samples	Total coliforms	TMAB
YK	< 1.0	8.24
Y1	< 1.0	7.61
Y2	< 1.0	7.33
Y3	< 1.0	7.29



## CONCLUSION

In this research, it was demonstrated that grape seed extract can be successfully used for the fortification of traditional yogurt. The addition of grape seed extract did not change the physicochemical quality characteristics of yogurt samples. There was an increase in antioxidant activities of traditional yogurt samples and sensory analyzes showed that the addition moderate (0.1-0.15 g/ 100 g) concentrations of extract had a desirable effect on sensorial characteristics. Therefore, the fortification of traditional yogurt with of low concentrations of grape seed extract may result favorable product in terms of sensorial characteristics and the yogurt gains functionality which makes this healthier dairy product more desirable in terms of consumer perception.

## REFERENCES

- Akdeniz DB.** Researches about ampelography and quality characteristics of some native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.) and investigation of chemical and organoleptic quality properties, colour index and total phenolic compound contents of wines made from these varieties in Afyonkarahisar region. PhD thesis, Ege University Graduate School of Natural and Applied Sciences, İzmir, 2010.
- Altug, T.** Sensory Test Techniques, Ege University Publication No. 28 Izmir, Turkey, 1993 (in Turkish).
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG.** Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 2000; 148:187-197.
- Cacace JE, Mazza G.** Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*. 2003; 59(4):379-389.
- Con AH, Cakmakci S, Caglar A, Gokalp HY.** Effects of different fruits and storage periods on microbiological qualities of fruit-flavored yogurt produced in Turkey. *Journal of Food Protection*. 1996; 59:402-406.
- Dabija A, Codina GG, Ropciuc S, Gatlan A, Rusu L.** Assessment of the antioxidant activity and quality attributes of yogurt enhanced with wild herbs extracts. *Hindawi Journal of Food Quality*. 2018; 2018:1-12., Doi: <https://doi.org/10.1155/2018/5329386>
- Granato D, Branco GF, Cruz AG, Faria JAF, Shah NP.** Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010; 9: 455-470.
- Harrigan WF, McCance ME.** Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press Inc. London, UK. 1976; 452p.
- Jang, MS, Cai EN, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM.** Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997; 275(5297): 218-220.
- Jayaprakash GK, Selvi T, Sakariah KK.** Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*. 2003; 36:117-122.
- Jayaprakash GK, Singh RP, Sakariah KK.** Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Journal of Food Science*. 2001; 73:285-290.
- Kavak DD, Akdeniz B.** Potential Application of Casein for the Inhibition of  $\beta$ -Glucuronidase Activity. *Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering*. 2016; 16(special issue 1):74-78.
- Kavak DD, Akdeniz B.** *Sorbus umbellata* (Desf.) Fritsch var. *umbellata* Leaves: Optimization of extraction conditions and investigation antimicrobial, cytotoxic, and  $\beta$ -Glucuronidase inhibitory potential. *Plant Foods for Human Nutrition*. (2019). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00743-9>
- Kavak DD, Kececi S.** Extraction of phenolic antioxidants from *Pyrus elaeagnifolia* Pallas: process optimization, investigation of the bioactivity and  $\beta$ -glucuronidase inhibitory potential. *Food Measurement and Characterization* (2019). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00210-8>
- Kavak DD, Ülkü S.** Kinetic and equilibrium studies of adsorption of  $\beta$ -glucuronidase by clinoptilolite-rich minerals. *Process Biochemistry*. 2015; 50:221-229.
- Kavak DD.** Optimization of extraction time, temperature and solvent concentration for the antioxidant activity and total phenolic content of the *Cydonia oblonga* mill. Leaves. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 2017; 11(6): 1-6.
- Kim SY, Jeong SM, Park WP, Nam K.C, Ahn DU, Lee SC.** Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food Chemistry*. 2006; 97:472-479.
- Majd MH, Rajaei A, Bashi DS, Mortazavi SA, Bolourian S.** Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomischema parvijlorum*) leaves using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*. 2014; 57:195-202.
- Mandić AI, Djilas SM, Čanadanović-Brunet JM, Četković GS, Vulić JJ.** Antioxidant activity of white grape seed extracts on DPPH radicals. *Acta Periodica Technologica*. 2009; 40:53-61.
- Nguyen L, Hwang ES.** Quality characteristics and antioxidant activity of yogurt supplemented with aronia (*Aronia melanocarpa*) juice. *Preventive Nutrition and Food Science*. 2016; 21(4):330-337.
- Nile SH, Park SW.** Edible berries: bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*. 2014; 30(2):134-144.
- Pelaes Vital AC, Goto PS, Hanai LN, Gomes-da-Costa SM, Filho BA, Nakamura CV, Matumoto-Pintro PT.** Microbiological, functional and rheological properties of low fat yogurt supplemented with *Pleurotus ostreatus* aqueous extract. *LWT-Food Science and Technology*. 2015; 64(2):1028-1035.
- Ranjitha CY, Priyanka S, Deepika R, Smitha Rani GP, Sahana J, Prashith Kekuda TR.** Antimicrobial activity of grape seed extract. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014; 3(8):1483-1488.
- Saito M, Hosoyama H, Ariga T, Kataoka S, Yamaji N.** Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998; 46:1460-1464.
- Sato M, Maulik G, Ray PS, Bagchi D, Das DK.** Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1999; 31:1289-1297.

- Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda YJ.** Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *Journal of Medicinal Food.* 2003; 6(4):291-299.
- Shyamala BN, Gupta S, Jyothi A, Prakas LJ.** Leafy vegetable extracts-antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 2005; 6(2): 239–245.
- Silva SV, Malcata FX.** Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal.* 2005; 15(1):1-15.
- Tamime AY, Deeth HC.** Yogurt: technology and biochemistry. *Journal of Food Protection.* 1980; 43(12):939-977.
- Tekinşen C, Atasever M, Keleş A., Tekinşen KK.** Süt, yoğurt, tereyağı, peynir: üretim ve kontrol. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 2002.
- Tomovska J, Gjorgievski N, Makarijoski B.** Examination of pH, titratable acidity and antioxidant activity in fermented milk. *Journal of Materials Science and Engineering A.* 2016; 6(11-12):326-333. doi: <https://doi.org/10.17265/2161-6213/2016.11-12.006>
- Wallace TC, Giusti MM.** Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from *Berberis boliviana L.* as compared to other natural/synthetic colorants. *Journal of Food Science.* 2008; 73(4): 241-248.

## Determination of D-Dimer Levels in Calves with Cryptosporidiosis

C. Çağrı CINGİ\*<sup>1</sup>, Mustafa KABU<sup>1</sup>, Hasan ERDOĞAN<sup>2</sup>, Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU<sup>3</sup>,  
Kerem URAL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, 03200, Afyon, Turkey

<sup>2</sup>Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, 09100, Aydın, Turkey

<sup>3</sup>Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, 68200, Aksaray, Turkey

### ABSTRACT

The aim of the present study was emphasized to estimation of D-dimer levels among calves with cryptosporidiosis. The study was conducted on 1-3 weeks old, 11 Holstein calves with *Cryptosporidiosis* (study group) and on 1-3 weeks old ten healthy Holstein calves (control group). Diagnosis of Cryptosporidiosis made by rapid test kits. Blood samples were taken from each animal, by puncture of the jugular vein and were collected into plain tubes without anticoagulant. D-dimer concentrations were detected by fluorescent immunoassay techniques in both study and control group calves. As a result, D-dimer values were significantly increased in infected calves when compared with the control group animals.

**Keywords:** Calf, Cryptosporidiosis, D-Dimer

\*\*\*

### Kriptosporidiazisli Buzağlarda D-Dimer Seviyelerinin Belirlenmesi

#### ÖZ

Bu araştırmada kriptosporidiazisli buzağlarda kan D-dimer seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmış olup, çalışmanın materyalini 1-3 haftalık, hızlı test kitleri ile Kriptosporidiazis belirlenen 11 Holstein buzağı (çalışma grubu) ve 1-3 haftalık on sağlıklı Holstein buzağı (kontrol grubu) oluşturmuştur. Her buzağının, *v. jugularis*'lerinden alınan kan örnekleri antikoagülansız tüplere toplanmış, D-dimer konsantrasyonları, hem çalışma hem de kontrol grubu buzağlarda floresan immunoassey tekniği ile belirlenmiştir. Sonuç olarak, D-dimer seviyeleri, kontrol grubu hayvanlara kıyasla enfekte buzağlarda önemli ölçüde yüksek saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Buzağı, Kriptosporidiazis, D-Dimer

To cite this article: Cingı C.Ç., Kabu M., Erdoğan H., Haydardedeoğlu A.E., Ural K. Determination of D-Dimer Levels in Calves with Cryptosporidiosis. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4):396-399.

Submission: 31.07.2019 Accepted: 02.10.2019 Published Online: 09.10.2019

ORCID ID; CÇC: 0000-0001-6286-6553, MK: 0000-0003-0554-7278, HE: 0000-0001-8109-8537,

AEH: 0000-0002-8473-0072, KU: 0000-0001-8109-8537

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

## INTRODUCTION

*Cryptosporidium parvum* infection is very common in young ruminants and can also be detected in many mammals. The infection occurs frequently in calves and can be detected at the earliest five days. 70% of cases occur in calves within 1-3 weeks. The main symptom is diarrhea and occurs at the age of 5-15 days. Transmission occurs directly by contact between calves. Stool excreted sporozoites and infected oocytes are the source of infection. The agent may also be spread indirectly through fomite or human transfer. *Cryptosporidium spp.* it may be infectious when sporulated in the host cells and passed into the feces. The feces are yellow in color and watery and contain mucous. (Kahn 2010).

D-dimer, a well known break down or degradation product of cross-linked fibrin, might be elevated due to clot formation/ fibrinolysis (Freyburger et al. 1998, Goldstein et al. 2001). Elevated circulatory D-dimer concentrations in relationship with DIC, thromboembolic disease, coagulative disorders thromboembolic disease and other relevant diseases (Goldstein et al. 2001, Nelson and Andreasen 2003, Griffin et al. 2003, Stokol 2003, Dewhurst et al. 2008). An elevated D-dimer value in plasma is a marker of a prothrombotic state, and its measurement might be helpful for prediction or prevention of thrombotic diseases (Marcucci et al. 2000). Therefore, in an attempt to investigate whether calves with a parasitic disease, as was the case in this study, could even exist probable prothrombotic condition, plasma D-dimer vales were analyzed in a subset of calves with naturally occurring cryptosporidiosis, compared to those of a healthy control calves. Only few (absolutely lacking) data is available on the occurrence of precoagulative status in calves with cryptosporidiosis Therefore, the objective of the present work was to study D-dimer levels among calves with cryptosporidiosis.

## MATERIALS and METHOD

The study was conducted on 1-3 weeks old, 11 Holstein calves with Cryptosporidiosis (study group) and on 1-3 weeks old ten healthy Holstein calves (control group). Diagnosis of *Cryptosporidium* made by rapid test kits from Bovid-5 Ag Test Kit, (BionoteInc.,Korea) Blood samples were taken from each animal, by puncture of the jugular vein and were collected into plain tubes without anticoagulant. D-dimer concentrations were detected by use of the Point-of-Care fluorescent immunoassay. The present author's clinic utilizes the Finecare FIA meter (FIAM) (Fluorescence Immunoassay Rapid Quantitative Test, Guangzhou Wondfo Biotech Co., Ltd., Atasan Ata teknik Ltd. Sti, Turkey) which is automated. The use of FIAM D-dimer analyzer has been validated for the first time in veterinary practice in our clinic in August

2014. In an attempt to determine whether the results obtained for D-dimer using the latter analyzer differed significantly and to quantify the limits of agreement between the results of immuno turbidometric assay and this analyzer, four of the samples were randomly selected and then were sent out for a private commercial laboratory for measurement and comparatively determined on same samples, which gave same results.

The FIAM requires 10 µl of undiluted serum and utilisesan Fluorescence Immunoassay methodology. A human anti-D-dimer monoclonal antibody was impregnated into the well on a supplied test cartridge by the manufacturer. Calves sera sample is then added; along with buffer solution, then were shaken for 30 seconds. Within this mixture 75 µl was taken, then were put on to the reading stribes, forwarded to the analyzer. The appropriate time for reading was 180 seconds [involving incubation]. FIAM D-dimer analyzer has a detectable range between 0.1-10 mg/L. The method was adapted within the manufacturer directions. Elevated D-dimer levels was set as (>0.1 g/ml).

Ethics committee approval was not enrolled in the present study, but it has been denoted that there is no need for approval of the ethics committee in non-experimental clinical veterinary practices index of Article 2 (b) of the Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments published in the Official Newspaper dated 15.02.2014 with no 28914 as was expressed. In the present study sera samples were withdrawn from sick animals, in an attempt to control their health status since it was understood that there was informed consent form in the study, ethics committee approval was not required for this study

## Statistical analysis

D-dimer data were shown as mean and standard deviations (mean ± SD). Data were checked for homogeneity and Mann-Whitney U test was performed to analyze the significance of alterations between Control and Infected groups. SPSS (22.0, IBM) program was used in statistical tests and  $p < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

D-dimer values were significantly increased in infected calves compared with the control animals ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

**Table 1.** D-Dimer Levels In Control and Study Groups.

Data	Groups		p value
	Control n=10	Infected n=11	
D-dimer (mg/L)	0.09±0 (0.09)	2.07±2.22 (0.09-6.2)	0.001

## DISCUSSION and CONCLUSION

Increased D-dimer levels might be dedicated to excessive amount of fibrinogen which converted to fibrin inside blood vessels due to fibrinolytic degradation. Given D-dimer as a fibrin related end product, the vast majority of diseases due to procoagulant stimuli, could be addicted to acute or chronic thrombotic and embolic changes (Mammen 2000). In the present study D-dimer levels (mean ±standart deviation) in healthy control vs. diseased calves [0.09±0 vs. 2.07±2.22) indicated elevated circulatory reaction. It was suggested that high levels of D-dimer that detected in calves with cryptosporidium are indicative of seriously impaired haemostasis and the development of secondary fibrinolysis associated with DIC. Increased D-dimer concentrations are indicative of secondary activation of the fibrinolysis system preceded by clotting activation and thrombin production, which are typical DIC symptoms (Matyszczak et al. 2008). D-dimer measurement is commercially easily available and reasonably priced, thus represents a probably ideal candidate marker for several diseases, at least for the calves enrolled herein. The present researchers could assume that D-dimer analysis may be useful for diagnosis of pre-coagulation status conditions, indicating that inflammatory conditions and coagulation might be in relationship. This was also mentioned in a prior review article, in which concluded that coagulation and acute inflammation follow all types of tissue trauma. The underlying mechanisms of cryptosporidiosis would be underlined beneath (Pottmeyer et al 1986). In clinical practice the usage of D-dimer analysis for interpretation of caogulopathy and inflammatory response, is currently be coming routine, whereas available evidence showed that D-dimer levels may be decreased with anticoagulation therapy (Couturaud et al, 2002) which might be the case in calves with cryptosporidiosis presenting high D-dimer values.

The underlying mechanisms for elevated D-imer leves in calves with cryptosporidiosis might be briefly discussed. Tool like receptor signalling over bovine and human epithelial cells existing within *C. parvum* infection resulted within pro-inflammatory cytokine, chemokines and antimicrobial peptide production, in which the latted respond induces protective immunity for combatting (Thomson et al. 2017). Besides elevated expression of the latter co-stimulatory

molecules, mouse bone marrow-derived dendritic cells reacting to *C. parvum* existed pro-inflammatory cytokines including TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-12 (Perez-Cordon et al, 2014). To those of TNF-alpha levels ( $p < 0.01$ ) were independently associated with elevated D-dimer levels in patients with non-metastatic lung cancer, suggesting that elevated concentrations of TNF-alpha could participate in activation of fibrinolysis (Guadagni et al. 2004). All those proposed mechanisms might be involved within the pathogenesis of existing iflammation and pre-coagulatory processing in cryptosporidiosis, in which to the present authors' knowledge this is the first study detecting D-dimer levels in calves with this infection. Obtained results should be taken into consideration, which would thus probably change treatment protocols for the future with naturally occurring crytosporidium infection among calves. The present authors have competing interests for further warranted researches.

## REFERENCES

- Kahn CM.** Digestive system. The Merck Veterinary Manual. 10th ed. New Jersey; Merck & Co; 2010. p. 129-445.
- Freyburger G, Trillaud H, Labrouche S, Gauthier P, Javorschi S, Bernard P, Grenier N.** D-dimer strategy in thrombosis exclusion--a gold standard study in 100 patients suspected of deep venous thrombosis or pulmonary embolism: 8 DD methods compared. *Thromb Haemost.* 1998; 79(1): 32–37.
- Goldstein NM, Kollef MH, Ward S, Gage BF.** The impact of the introduction of a rapid d-dimer assay on the diagnostic evaluation of suspected pulmonary embolism. *Arc Intern Med.* 2001; 161(4): 567-571.
- Nelson OL, Andreassen C.** The utility of plasma d-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *J Vet Intern Med.* 2003; 17(6): 830–834.
- Griffin A, Callan MB, Shofer FS, Giger U.** Evaluation of a canine D-dimer point-of-care test kit for use in samples obtained from dogs with disseminated intravascular coagulation, thromboembolic disease, and hemorrhage. *Am J Vet Res.* 2003; 64(12): 1562–1569.
- Stokol T.** Plasma D-dimer for the diagnosis of thromboembolic disorders in dogs. *Vet Clin N Am-Small Journal.* 2003; 33(6): 1419–1435.
- Dewhurst E, Cue S, Crawford E, Papisoulitis K.** A retrospective study of canine D-dimer concentrations measured using an immuno-metric “Point-of-Care” test. *J Small Anim Pract.* 2008; 49 (7): 344–348.
- Marcucci R, Prisco D, Brunelli T, Pepe G, Gori AM, Fedi S, Capanni M, Simonetti I, Federici G, Pastore A, Abbate R, Gensini GF.** Tissue factor and homocysteine levels in ischemic heart disease are associated with angiographically documented clinical recurrences after coronary angio-plasty. *Thromb Haemost.* 2000; 83 (6): 826–832.
- Mammen EF.** Oral contraceptive pills and hormonal replacement therapy and thromboembolic disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2000; 14(5); 1045-1059.
- Matyszczak L, Niedzwiedz A, Paslawska U, Nicpon J, Sikorska A.** D-dimer as an indicator of intravascu-lar

clotting in horses and dogs. *Med Weter.* 2008; 64: 272-275.

**Pottmeyer E, Vassar MJ, Holcroft JW.** Coagulation, inflammation, and responses to injury. *Crit Care Clin.* 1986; 2 (4): 683-703.

**Couturaud F, Kearon C, Bates SM, Ginsberg JS.** Decrease in sensitivity of D-dimer for acute venous thromboembolism after starting anticoagulant therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002; 13(3): 241-246.

**Thomson S, Hamilton CA, Hope JC, Katzer F, Mabbott NA, Morrison LJ, Innes EA.** Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Vet Res.* 2017; 48: 42.

**Perez-Cordon G, Yang G, Zhou B, Nie W, Li S, Shi L, Tzipori S, Feng H.** Interaction of *Cryptosporidium parvum* with mouse dendritic cells leads to their activation and parasite transportation to mesenteric lymph nodes. *Pathog Dis.* 2014;70: 17-27.

**Guadagni F, Ferroni P, Basili S, Facciolo F, Carlini S, Crecco M, Martini F, Spila A, D'Alessandro R, Aloe S, Cerasoli V, Del Monte G, Mariotti S, Mineo TC, Roselli M.** Correlation between tumor necrosis factor- $\alpha$  and D-dimer levels in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2004; 44(3): 303-310.

## The New Mastitis Agents Emerged in Cattle in Turkey and An Investigation of Their Antimicrobial Susceptibility

Beytullah KENAR<sup>1\*</sup>, Adil AKSOY<sup>2</sup>, Zahide KÖSE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, 03200, Afyonkarabısar, Turkey

<sup>2</sup>Aksaray University, Eskiil Vocation School, Aksaray, Turkey

<sup>3</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, 03200, Afyonkarabısar, Turkey

### ABSTRACT

There are new emerging cattle mastitis agents that have become a major burden economically on the dairy industry because of their negatively affects on production and quality in dairy cattle farming in Turkey. To overcome this emerged problem, antimicrobials are adopted in this sector to prevent and administrate mastitis and other bacterial infections affecting cattle in the country. Nevertheless, the occurrence of antimicrobial resistance (AMR) is increasing in both animal and human contaminants. The occurrence and features of AMR of the emerging cattle mastitis agents in dairy cattle in Turkey, have been manifested. As a result, the goal of this research was to assess secluded emerging cattle mastitis agents in Turkey and to appraise the antimicrobial susceptibility of these pathogens. Sixty one milk samples from cattle wwith mastitis were collected between 2014 and 2018 for assessment of clinical mastitis in diagnostic and analysis laboratory of Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University. Twenty five microorganism species arised as cattle mastitis agents were assessed in these milk samples. The outcomes of the present study identified the necessity for advancements in antimicrobial stewardship as well as infection administration plans in Turkish farms to decrease the occurrence of AMR. VITEK Compact® 2 systemmethod showed that *Streptococcus uberis* had the maximum AMR while *Globicatella sulfidifaciens* had the minimum AMR. The study depicts that the number of cattle mastitis is directly proportional to the size of the herd.

**Keywords:** Cattle, mastitis, new agent, antimicrobial resistance.

\*\*\*

### Türkiye'de Yeni Sıgır Mastitis Ajanları ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Araştırılması

#### ÖZ

Türkiye'deki sütçü ineklerinin üretim ve kalitesine olumsuz yönde etkileyen ve süt endüstrisine ekonomik olarak büyük bir zarar oluşturan yeni ortaya çıkan sıgır mastitis etkenleri bulunmaktadır. Giderek artan bu sorunun üstesinden gelmek için, bu sektörde mastitis ve ülkedeki inekleri etkileyen diğer bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi ve yönetilmesi amacıyla antimikrobiyaller kullanılmaktadır. Bununla birlikte, antimikrobiyal direncin (AMR) oluşumu hem hayvan hem de insan kontaminantlarında artmaktadır. Türkiye'deki sütçü ineklerinden ortaya çıkan sıgır mastitis etkenlerinde antimikrobiyal direncin oluşumu ve özellikleri açıkça ortaya konmuştur. Sonuç olarak, bu araştırmanın amacı, Türkiye'de ilk kez tespit edilen inek mastitis etkenlerini ve bu patojenlerin antimikrobiyal duyarlılığını değerlendirmektir. Bu çalışmada Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Teşhis ve Analiz Laboratuvarında klinik mastitisin değerlendirilmesi için 2014-2018 yılları arasında 61 adet mastitisli süt örneği incelenmiştir. Bu süt örneklerinden Türkiye'de ilk kez izole edilen 25 sıgır mastitis ajanı değerlendirilmiştir. Mevcut araştırmanın sonucu, AMR'nin gelişimini azaltmak için Türkiye çiftliklerindeki enfeksiyon yönetiminin planlanmasının yanı sıra antimikrobiyal geliştirilmesinin gerekliliğini de ortaya koymuştur. VITEK Compact® 2 yöntemi *Streptococcus uberis*'in maksimum AMR, *Globicatella sulfidifaciens*'in ise minimum AMR geliştirdiğini göstermiştir. Çalışma, ortaya çıkan sıgır mastitis sayısının doğrudan sürü büyüklüğü ile orantılı olduğunu da ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** İnek, mastitis, yeni ajan, antimikrobiyal direnç.

To cite this article: Kenar B, Aksoy A, Köse Z. The New Mastitis Agents Emerged in Cattle in Turkey and An Investigation of Their Antimicrobial Susceptibility. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4):400-406.

Submission: 05.09.2019

Accepted: 05.10.2019

Published Online: 09.10.2019

ORCID ID; BK: 0000-0001-6573-680X, AA: 0000-0002-1521-3100, ZK: 0000-0002-2914-1582

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

## INTRODUCTION

Numerous emerging cattle mastitis agents have turned to be a critical economic liability on the dairy sector because they adversely impact milk quality and milk yield. According to Du et al. 2018, cattle mastitis is a disorder triggered by a diversity of microorganism's contaminations that result to major economic damages and losses to the breeding sector via reducing the production of milk as well as raising culling and antibiotic treatments costs (Sztachńska et al. 2016). Usually, fungal contaminations of mammary gland are instigated by yeast, of which the primary species are *Candida* spp.. The occurrence of mastitis happens when white blood cells are generated into the mammary gland, commonly in reaction to microorganisms attacking the teat canal or sometimes by thermal, mechanical or chemical disturbance on the udder (Sonmez and Erbas 2017). As a result, the tissue responsible for milk secretion as well as several ducts in the mammary gland are impaired because of the toxins produced by the bacteria that consequently lead to a decrease of milk quality and yield. The presence of the infection can be recognized by udder disorders like pain, tenderness, hardness, fever, skin redness and swelling (Hosseinzadeh and Saei 2014). Measures like efficiently dairy cattle nourishment, proper housing administration, culling of frequently-diseased cows and milking sanitation to enhance the well-being of the cattle are significant in the regulation of herd mastitis stages. The determination of the mastitis agents is significant when choosing the correct antimicrobial treatment (Martin et al. 2018).

In the current study, 25 species of emerging dairy cattle mastitis agents were assessed in Turkey. These emerging mastitis agents are commonly located in udder tissues (Das et al. 2017). Mastitis agents that are spread from one cattle to another are referred to as contagious pathogens while those that are present in the herd's vicinities are called environmental pathogens. The differentiation between these two types of mastitis pathogens is significant in examining the problems present in the cattle as well as the control measures that might be adapted to treat or decrease this disorder (Martí-Carrizosa et al. 2015). Contagious agents adhere simply to the cattle skin, inhabiting the end of the teat and develop into the teat canal where the contamination happens. Due to this, post-milking disinfection of the teat, as well as dry cow treatment play a significant function in regulating contagious mastitis (Xiao et al. 2014). Regarding the environmental mastitis, the agents can gain access to the teat canal forcefully in the course of milking like when liner slippage happens (Rocha et al. 2016). The environmental agents of mastitis do not commonly possess identical capability as contagious pathogens to attach to as well as to colonize the teat (Kadariya et al. 2014). As a result, dry cattle treatment has little value in their regulations since these types of

contaminations do not carry from one lactation to another (Sonmez and Erbas 2017). Cattle mastitis agents can contaminate the cows when they are lactating as well as during the dry season. It is thus crucial to recognize and determine the causes of these infections since the treatment, control, and prevention methods of the agent's impacts can vary based on if the contamination happens when the cow is lactating or dry (Eldesouky et al. 2016). Identification of agents which cause cattle mastitis to enhance the selection of the appropriate antimicrobial therapy is then conducted. Antimicrobials are implemented in the dairy sector for control and prevention of mastitis as well as other bacterial disorders impacting dairy cows. Reliance on antimicrobials has turned out to be a broad spectacle in the dairy industry (Cheng et al. 2019). Beta-lactam antibiotics are usually adopted in handling cattle mastitis agents. Bacterial opposition to beta-lactam mechanisms comprises of generation protein which is a low-affinity penicillin-binding as well as secretion of beta-lactamases (Ksouri et al. 2015). Antibacterial agents from crops are substantial sources of new antibiotics compounds and efflux pump inhibitors which target bacterial virulence or can be adopted in mixture with other prevailing drugs (Sartori et al. 2014). The plants generate a significant constituent of ethno-veterinary remedy that is implemented in the therapy of diverse disorders such as bovine mastitis (Sağlam et al. 2017). Nevertheless, antimicrobial resistance (AMR) arises when the pathogens are capable of overcoming the impact of antimicrobials which were efficient previously (Zhang et al. 2018). In Turkey, AMR remains a substantial threat in the dairy industry. According to WHO (2015), AMR is one of the biggest dangers to international food security, health and progression. In many nations including Turkey, variations in the absolute and relative significance of the primary mastitis agents have been detected over time, possibly due to the marked modifications in the dairy sector (Erbaş et al. 2017). The objective of the current assessment was to examine isolated emerging cattle mastitis agents in Turkey and to evaluate the antimicrobial susceptibility of these pathogens.

## MATERIAL and METHODS

### Culture of Milk Samples

The current study was conducted according to the guidelines of the Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine diagnostic and analysis. A total of 61 milk samples of cattle with mastitis were collected between 2014 and 2018 in diagnostic and analysis laboratory of Faculty of Veterinary Medicine in Afyon Kocatepe University for analysis of clinical mastitis agents. All cultural procedures of milk samples were pursued in line with Gao et al. (2017). In a precise manner, 100 µl of milk sample was plated on blood agar (Oxoid, CM0055) supplemented with



7% sheep blood, on C.L.E.D Medium (CM0301 Oxoid) and on Eosin Methylene Blue agar (Oxoid, CM0069) plates. The plates were then incubated aerobically at 37°C for 24-48 hours. All samples were considered as culture positive in the case that one or more colonies were observed. The samples which had two different bacterial colonies were put into a group of mixed culture while those which had more than two colonies were assumed as contaminated (Verbeke et al. 2014).

## Identification of Microorganisms

### Colony characteristics

Pigmentation of colonies on blood agar was initially evaluated by the reference of Quin et al. (1999). On blood agar plates, the beta-hemolytic Smooth (S) colonies with a golden yellow color was assumed as *Staphylococcus aureus* whereas non-hemolytic porcelain-white pigmented colonies were considered as *Staphylococcus epidermidis*. The colonies of *Staphylococcus saprophyticus* show a white or bright pigmentation without hemolysis on blood agar.

### Catalase test

This test provides to detect if a particular bacterial isolate is able to produce catalase enzyme which is produced by microorganisms that live in oxygenated environments to neutralize toxic forms of oxygen metabolites such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. To test enzymatic activity, a small inoculum of a bacterial isolate is mixed into hydrogen peroxide solution (3%) on a dry glass microscope slide and is observed for the rapid elaboration of oxygen bubbles (Quinn et al. 1999). This test was used in the current study as a way of distinguishing among Gram (+) cocci. The members of *Enterococcus* and *Streptococcus* in general are catalase-negative while those the genus *Staphylococcus* are catalase-positive.

### Coagulase test

Coagulase test is used to differentiate *S. aureus* (positive) from Coagulase Negative Staphylococcus (CNS). Coagulase is an enzyme produced by *S. aureus* that converts fibrinogen in plasma to fibrin. *S. aureus* produces two forms of coagulase, bound and free. Slide coagulase test is done to detect bound coagulase or clumping factor while tube coagulase test is done to detect free coagulase. In this study, slide coagulase test is initially adopted to screen bound coagulase of *S. aureus* as well as the tube coagulase test was used for further confirmation of free coagulase (Quinn et al. 1999). During the slide test, the sample on the test was added to a rabbit plasma and kept constant at 37°C for quite a while. In the occurrence of a positive outcome, clot formation occurs within 4 hours. A virulent strain indicates an adverse effect. In the current study, the slides were separated into units using a grease pencil. One was labeled as 'test' while the other as 'control.' Each of the samples was placed a small drop of condensed water on each area.

The two colonies of *Staphylococcus* were emulsified on the blood agar plate on each drop as a way of making a smooth suspension (Schukken et al. 2014). The 'test' suspension was treated with a drop of citrated plasma after which it was mixed with a needle. It is advisable to keep the other drop as it is since it is a control experiment. The control suspension was the one used to rule out false positivity as a result of autoagglutination. There was clumping of cocci within the first 5-10 seconds which indicated a positive remark.

### Gram properties

A study was done as a way of evaluating the VITEK 2 Gram staining Gram (-) and Gram (+) with an identification card of VITEK 2 automated identification system (Kaur et al. 2016). This card was crucial in the identification of fermenting and non-fermenting agent organisms such as *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia cepacia*.

### Recovery of Isolates

The initial steps included bacterial recovery on a tryptic soy agar plates which were then incubated at a 37°C for a whole day. Colonies were then transferred into Mueller-Hinton Broth medium which contained a 5% bovine serum added for *Streptococcus* spp. The mix was shaken at a constant temperature for 12 hours. A turbidimeter for bacteria was utilized in adjusting the suspension to a 0.5 McFarland standard density.

### Antibiogram tests

Phenotypic assessment of antimicrobial susceptibility was achieved via the use of microdilution method used in line with the Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) guidelines. Antimicrobials which were evaluated for Gram (+) bacteria included the following: Penicillin/Novobiocin (Bioanalyse 0.01/0.03 mg/ml), Oxytetracycline (Bioanalyse 0.03 mg/ml), Danofloxacin (Bioanalyse 5 µg/ml), Ceftiofur (Oxoid 0.03 mg/ml), Lincomycin/Spectinomycin (Oxoid 0.109 mg/ml), Gentamicin (Bioanalyse 0.01 mg/ml), Oxytetracycline (Bioanalyse 0.03 mg/ml), Erythromycin (Bioanalyse 0.015 mg/ml) and Amoxicillin/Clavulanic Acid (Bioanalyse 0.02/0.01 mg/ml). The test was made according to CLSI (2016) using Mueller Hinton Agar (CM 0337 Oxoid) medium to test bacterial susceptibility against to different concentration of antibiotics emdedded in discs.

## RESULT

The microorganisms identified in this study and antibiogram test results are shown in Table 1a,b. In the test out of 61 samples, 11 characterized as Gram (+) organisms. In addition, 50 isolates of Gram (-) fermenting and non-fermenting *Burkholderia* and *B.*

*pseudomallei* were screened by Gram stain. Out of the 61 samples were investigated, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *E. coli*, and *S. epidermidis* were the most emerging cattle mastitis. The current study shows that *E. coli* and *Klebsiella* spp. seem to be resistant to Amoxicillin-Clavulanic Acid (76% and 34%) which is slightly high than reports done before. The prevalence of *Escherichia coli* was also lower.

The identified microorganisms include *Staphylococcus aureus* (n=4), *Staphylococcus haemolyticus* (n=5), *Candida kefir* (n=1), *Lactococcus garvieae* (n=1), *Globicatella sulfidifaciens* (n=1), *Aerococcus viridans* (n=2), *Brevibacillus*

*choshinensis* (n=2), *Bacillus licheniformis* (n=1), *Pseudomonas aeruginosa* (n=1), *Aerococcus viridans* (n=2), *Streptococcus uberis* (n=1), *Leuconostoc mesenteroides* (n=1), *Micrococcus luteus* (n=1), *Burkholderia cepacia* (n=1), *Escherichia coli* (13), *Pasteurella multocida* (n=1), *Sphingomonas paucimobilis* (n=3), *Kocuria rosea* (n=1), *Kocuria rhizophila* (n=3), *Kocuria kristinae* (n=1), *Kocuria varians* (n=1), *Staphylococcus chromogenes* (n=1), *Staphylococcus simulans* (n=2), *Staphylococcus saprophyticus* (n=3) and *Staphylococcus epidermidis* (n=8). Thus, 25 different bacteria were identified in mastitic milk samples of cattle and this is the first in Turkey.

**Table 1a.** Microorganisms isolated in the present study and antibiogram test results of isolates

Year	Bacteria	Antibiotics							
		Sefifur	Danofloxacin	Penicillin / Novobiocin	Lincomycin / Spectinomycin	Gentamicin	Oxytetracycline	Erythromycin	Amoxicillin / Clavulanic acid
2014	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	1	3	3	2	3	1
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	0	0	0	1	0	3	0
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	0	0	0	1	0	2	0
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	0	0	0	1	0	2	2
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	2	1	0	2	1	3	2
2015	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	3	2	2	3	1	3	2
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3	1	3	3	2	1	3	1
	<i>Staphylococcus simulans</i>	3	1	2	3	0	2	3	2
	<i>Staphylococcus simulans</i>	0	0	0	1	0	2	2	3
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	0	0	1	0	1	3	1
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	1	0	1	0	1	2	1
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	0	0	0	0	2	0	2
2016	<i>Kocuria rosea</i>	3	3	3	3	3	3	3	3
	<i>Pasteurella multocida</i>	3	2	3	3	2	3	2	3
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3	2	3	0	0	2	0	3
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3	3	3	3	3	3	3
	<i>Streptococcus uberis</i>	2	1	3	1	2	0	0	3
	<i>Aerococcus viridans</i>	3	3	3	3	3	3	3	3
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	3	0	3	3	2	2	0
	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	0	2	0	0	0	1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3	3	3	3	3	3	3
	<i>Escherichia coli</i>	3	0	2	1	3	3	0	1
	<i>Escherichia coli</i>	3	3	0	1	2	2	0	3
	<i>Escherichia coli</i>	3	3	0	1	2	2	2	2
	<i>Escherichia coli</i>	3	3	0	1	3	0	2	2
	<i>Escherichia coli</i>	3	3	3	2	3	3	3	3
	<i>Escherichia coli</i>	3	1	2	3	2	3	2	3
	<i>Escherichia coli</i>	2	1	2	2	2	1	0	2
	<i>Escherichia coli</i>	3	3	0	1	1	3	2	2
	<i>Escherichia coli</i>	3	3	3	2	2	2	2	2
	<i>Escherichia coli</i>	3	3	0	1	3	0	0	0
	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	2	3	2	3	2	3	3	3
<i>Brevibacillus choshinensis</i>	2	3	2	2	2	3	3	1	
<i>Kocuria varians</i>	3	3	3	1	0	0	0	3	
<i>Aerococcus viridans</i>	3	2	3	2	2	2	2	3	
<i>Globicatella sulfidifaciens</i>	3	3	3	2	2	0	0	3	
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1	3	3	2	3	2	0	3	

Note: The numbers in the table indicate AMR.

0= Resistant, 1= Insensitive, 2= Moderate sensitive, 3= Susceptibility

**Table 1b.** Microorganisms isolated in the present study and antibiogram test results of isolates

Year	Bacteria	Antibiotics							
		Seftiofur	Danofoxacin	Penicillin / Novobiocin	Spectinomycin / Lincomycin	Gentamicin	Oxytetracycline	Erythromycin	Anoxicillin / Clavulanic acid
2017	<i>Kocuria rhizophila</i>	2	1	0	0	0	0	0	1
	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	3	3	3	2	3	3	3	3
	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	3	3	3	3	0	2	3	3
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	3	3	3	3	0	0	3
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	3	3	3	3	0	0	3
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	3	3	3	3	3	0	3
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	3	3	3	3	3	3	3
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	3	3	3	3	3	0	3
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	3	3	3	3	0	0	3
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	3	3	3	3	3	3	3
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	3	3	3	3	3	3	3
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	2	2	3	3	0	3	3
	<i>Kocuria varians</i>	3	3	3	3	3	3	3	3
	<i>Lactococcus garvieae</i>	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>Kocuria kristinae</i>	3	3	3	3	0	0	3	3	
2018	<i>Escherichia coli</i>	3	0	1	3	3	3	0	3
	<i>Escherichia coli</i>	3	3	1	3	3	2	0	3
	<i>Escherichia coli</i>	3	0	0	3	3	0	0	3
	<i>Kocuria varians</i>	3	3	2	0	0	0	0	3
	<i>Kocuria varians</i>	3	3	3	0	1	3	0	3
	<i>Kocuria rhizophila</i>	3	2	3	0	0	0	0	3
	<i>Kocuria rhizophila</i>	3	3	3	0	1	0	0	3
	<i>Micrococcus luteus</i>	3	1	3	2	3	0	3	3
	<i>Burkholderia cepacia</i>	3	3	3	3	3	2	3	3
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	3	3	0	3	3	3	3	3	

Note: The numbers in the table indicate AMR.

0= Resistant, 1= Insensitive, 2= Moderate sensitive, 3= Susceptibility

## DISCUSSION

In the current research, 25 different microorganisms were isolated from cattle mastitis upon the approval of Afyon Kocatepe University Faculty of Veterinary Medicine diagnostic and analysis laboratory. According to Stevens (2018), since bacterial contaminations are the principal cause of cattle mastitis, antimicrobial treatment was identified as the appropriate control and prevention method for this disorder. Prompt therapy with efficient antimicrobials was identified as a crucial approach to minimize the threat of fatal effect, particularly for Gram (+) bacterial impurities. Nevertheless, regardless of the most effective antimicrobial therapies, failures of bacterial treatment are usual. According to WHO (2015), the adoption of antimicrobial agents is related to the threat of prompting the opposition to antimicrobial causes amongst bacteria. There was a substantial proportion of bacteriologically negative results which was in line with other reviewed studies (Seyedmousavi et al. 2018). The probable explanations for bacteriologically negative results in

the milk trials could be the occurrence of antibacterial constituents in the milk which led to a reduction in the bacterial viability in the culture or inefficiency in conventional culture as likened to the recognition of bacterial by use of real-time polymerase sequence response (Seyedmousavi et al. 2018). There was a strong correlation between the isolated mastitis agents of cattle and big farm size. Rapid variations in administration approaches that is from tie-stalls to free-stalls have been manifested from 2014 to 2018 thus explaining the cohabitation of environmental agents (Alvarez-Uria et al. 2018). Even though teat decontamination as well as dry treatment is a usual method in Turkish farms, appropriate eradication techniques for the emerging cattle mastitis were not suitably implemented. A increasing proportion of findings shows that the new emerging mastitis agents was associated with farms with less than 30 cattle (Gopal et al. 2015). Catalase test, coagulase assessment, Gram staining as well as recovery of isolates approaches for antimicrobial susceptibility examination were adopted in this research. These techniques are broadly implemented for recognition

of the susceptibility of animal pathogens, particularly in clinical studies when it is important to decide the most appropriate therapy (Cavassin et al. 2015). However, the outcomes were reported on a qualitative basis and subtle variations in susceptibility were not obvious. As a result, over-dependence on the implementation of antimicrobial to decrease the impact of mastitis in cattle was not maintainable. The AMR was determined in 25 cattle mastitis isolates. Vancomycin and daptomycin antibiotics which are significant for use by a human were examined for Gram (+) cocci. On the other hand, polymyxin B and imipenem antibiotics were assessed for Gram (-) bacteria. The grain straining approach depicted that *Streptococcus uberis* had the highest AMR while *Globicatella sulfidifaciens* had the least AMR. The current study emphasized the worrying trend of AMR rates increases in dairy cattle in Turkey.

There are inadequate techniques in handling mastitis which needs to be enhanced due to the culture which is quite tiresome. In addition, to recognize the pathogens, responses such as PCR are to be done independently for different pathogens. The case of mastitis has seen many countries become economic dwarf each year (Erbaş et al. 2017). Loses due to mastitis are not only on the reduction of milk but also lead to further expenditures which include treatments of the disease and quarantine of animals deemed to be diseased. Bovine mastitis is common in Turkey among other nations affecting dairy cattle worldwide with most countries relying on antimicrobial therapy tool for mastitis. It is, however, worthy to note that change of farm culture in farms as mastitis is not only a dairy issue. Researchers from the Penn state have given a recommendation on the infusion of cephapirin benzathine, which should be administered during the stage of winning in the way of limiting mastitis during the preceding lactation (Pohlmann et al. 2018). However, this can work in reducing existing infections other than new ones. Another study done in Oklahoma suggested an intra-muscular injection of antibiotics (oxy-tetracycline) during the winning stage as a way of mitigating mastitis (Dhikusooka et al. 2016). However, the drug did not work as expected as almost 54% of cows were infected at winning while the remaining percentage was infected at their calving stage.

The outcome of the present research identified the necessity for advancements in antimicrobial management as well as infection regulation plans in dairy farms to decrease the development of AMR. In conclusion; the current study recommends critical control points to include the following; enough nutrition which is balanced so as to stabilize immunity, farms should observe hygiene quality in their facilities and pastures as a way of limiting opportunistic diseases for udder as well as reducing fly breeding sites. The study depicts that the number

of emerging cattle mastitis is directly proportional to the size of the herd. The emerging new dairy cattle mastitis in Turkey is an associate of the general hygiene guidelines not being pursued.

## REFERENCES

- Alvarez-Uria G, Gandra S, Mandal S, Laxminarayan R.** Global forecast of antimicrobial resistance in invasive isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Infect Dis.* 2018; 68: 50-53.
- Cheng J, Herman Qu W, Barkema HW, Nobrega DB, Gao J, Liu G1, De Buck J, Kastelic JP3, Sun H4, Han B.** Antimicrobial resistance profiles of 5 common bovine mastitis pathogens in large chinese dairy herds. *J Dairy Sci.* 2019; 1-11.
- Cavassin ED, de Figueiredo LF, Otoch JP, Seckler MM, de Oliveira RA, Franco FF, Marangoni VS, Zucolotto V, Levin AS, Costa SF.** Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *J Nanobiotechnology.* 2015; 13 (1): 64.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 25th informational supplement. CLSI document m100-s25, 2015.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 26th edition. 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087 USA, 2016.
- Das A, Guha C, Biswas U, Jana PS, Chatterjee A, & Samanta I.** Detection of emerging antibiotic resistance in bacteria isolated from subclinical mastitis in cattle in West Bengal. *Vet World.* 2017; 10 (5): 517-520.
- Du J, Wang X, Luo H, Wang Y, Liu X, Zhou X.** Epidemiological investigation of non-albicans *Candida* species recovered from mycotic mastitis of cows in Yinchuan, Ningxia of China. *BMC Vet Res.* 2018; 14 (1): 251.
- Dhikusooka MT, Ayebazibwe C, Namatovu A, Belsham GJ, Siegismund HR, Wekesa SN, Balinda SN, Muwanika VB, Tjørnehøj K.** Unrecognized circulation of sat 1 Foot-and-Mouth Disease virus in cattle herds around Queen Elizabeth National Park in Uganda. *BMC Vet Res.* 2016; 12 (1): 5.
- Eldesouky I, Mohamed N, Khalaf D, Salama A, Elsify A, Ombarak R, El-Ballal S, Effat M, Al Shabrawy M.** *Candida* mastitis in dairy cattle with molecular detection of *Candida albicans*. *Kafkas Univ J Fac Vet Med.* 2016; 22 (3): 461-4.
- Erbaş G, Parın U, Kirkan Ş, Savaşan S, Özavcı V, Yüksel HT.** Identification of candida strains with nested pcr in bovine mastitis and determination of antifungal susceptibilities. *Turkish J Vet Anim Sci.* 2017; 41 (6): 757-763.
- Gao J, Barkema HW, Zhang L, Liu G, Deng Z, Cai L, Shan R, Zhang S, Zou J, Kastelic JP, Han B.** The incidence of clinical mastitis and distribution of pathogens on large Chinese dairy farms. *J Dairy Sci.* 2017; 100 (6): 4797-4806.
- Gopal N, Hill C, Ross PR, Beresford TP, Fenelon MA, Cotter PD.** The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Front Microbiol.* 2015; 6: 1418.

- Hosseinzadeh S, Saei HD.** Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the north west of Iran: Emerging of Coagulase-Negative Staphylococci. *Inte J Vet Sci Med.* 2014; 2 (1): 27-34.
- Kaur R, Dhakad MS, Goyal R, Haque A, Mukhopadhyay G.** Identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* species: A comparison of Vitek-2 system with conventional and molecular methods. *J Glob Infect Dis.* 2016; 8 (4): 139-146.
- Kadariya J, Smith T, Thapaliya D.** *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health. *Biomed Res Int* 2014: 827-965.
- Ksouri S, Djebir S, Hadeif Y, Benakhla A.** Survey of bovine mycotic mastitis in different mammary gland statuses in two north-eastern regions of Algeria. *Mycopathologia.* 2015; 179 (3-4): 327-331.
- Martí-Carrizosa M, Sánchez-Reus F, March F, Cantón E, Coll P.** The implication of *Candida parapsilosis* FKS1 and FKS2 mutations in reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59 (6): 3570-3573.
- Martin P, Barkema HW, Brito LF, Narayana SG, Miglior F.** Symposium review: Novel strategies to genetically improve mastitis resistance in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2018; 101 (3): 2724-2736.
- Pohlmann A, Starick E, Grund C, Höper D, Strebelow G, Globig A, Staubach C, Conraths FJ, Mettenleiter TC, Harder T, Beer M.** Swarm incursions of reassortants of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus strain H5N8 and H5N5, Clade 2.3. 4.4 B, Germany, Winter 2016/17. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 15.
- Quinn PJ, ME Carter, B Markey, GR Carter.** Bacterial Pathogens: Microscopy, Culture, And Identification. In: *Clinical Veterinary Microbiology.* Mosby, London, UK, Pp. 1999; 21-67.
- Rocha MFG, Alencar LP, Paiva MAN, Melo LM, Bandeira SP, Ponte YB, Sales JA, Guedes GM, Castelo-Branco DS, Bandeira TJ, Cordeiro RA, Pereira-Neto WA, Brandine GS, Moreira JL, Sidrim JJ, Brilhante RS.** Cross-resistance to fluconazole induced by exposure to the agricultural azole tetraconazole: An environmental resistance school?. *Mycoses.* 2016; 59 (5): 281-290.
- Sağlam A. G, Şahin M, Çelik E, Çelebi Ö, Akça D, & Otlı S.** The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. *Veterinary world,* 2017; 10 (12): 1481.
- Sartori LCA, Santos RC, Marin JM.** Identification of *Candida* species isolated from cows suffering mastitis in four Brazilian states. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia.* 2014; 66 (5): 1615-1617.
- Seyedmousavi S, Bosco SMG, de Hoog S, Ebel F, Elad D, Gomes RR, Jacobsen ID, Jensen HE, Martel A, Mignon B, Pasmans F, Piecková E, Rodrigues AM, Singh K, Vicente VA, Wibbelt G, Wiederhold NP, Guillot J.** Fungal infections in animals: A patchwork of different situations. *Med Mycol.* 2018; 56 (suppl-1): 165-187.
- Sonmez M, & Erbas G.** Isolation and identification of *Candida* spp. from mastitis cattle milk and determination of antifungal susceptibilities. *Int J Vet Sci.* 2017; 6 (2): 104-107.
- Schukken Y, Chuff M, Moroni P, Gurjar A, Santisteban C, Welcome F, Zadoks RN.** The “other” Gram-negative bacteria in mastitis: Klebsiella, Serratia, and more. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2014; 28: 239–256.
- Stevens M.** Antimicrobial consumption on Flemish dairy herds: Quantification, associated factors and mastitis management input as a basis for appropriate use (doctoral dissertation, Ghent University). 2018.
- Sztachańska M, Barański W, Janowski T, Pogorzelska J, Zduńczyk S.** Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland. *Pol J Vet Sci.* 2016; 19 (1): 119-124.
- Vikram A, Bomberger J, Bibby KJ.** Efflux as a glutaraldehyde resistance mechanism in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59 (6): 3433-40.
- Xiao Fan X, Chen SC, Wang H, Sun ZY, Liao K, Chen SL, Yan Y, Kang M, Hu ZD, Chu YZ, Hu TS, Ni YX, Zou GL, Kong F, Xu YC.** Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3-year national surveillance. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 70 (3): 802-810.
- World Health Organisation (WHO).** *Global Action Plan On Antimicrobial Resistance.* 2015. Retrieved from <http://www.who.int/drug-resistance/global-action>.
- Zhang S, Piepers S, Shan R, Cai L, Mao S, Zou J, Ali T, De Vliegher S, Han B.** Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine clinical mastitis in 5 provinces of China. *J Dairy Sci.* 2018; 101 (4): 3344–335.

## Evaluation of Antifungal Activity of Some Benzothiazole Derivatives

Derya OSMANİYE<sup>1,2</sup>, Begüm Nurpelin SAĞLIK<sup>1,2</sup>, Ulviye ACAR ÇEVİK<sup>1,2</sup>, Mustafa ESER<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, Eskişehir, Turkey

<sup>2</sup>Doping and Narcotic Compounds Analysis Laboratory, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, Eskişehir, Turkey

<sup>3</sup>Open Education Faculty, Anadolu University, Eskişehir, 26470, Turkey

### ABSTRACT

The antifungal activity of the previously synthesized compounds was evaluated in order to provide solutions to the candida-induced diseases in animals. In the present study, 10 benzothiazole derivatives (4a-4j) were re-synthesized to evaluate their antifungal activity. IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C-NMR and HRMS (Infrared Spectroscopy, <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, High Resolution Mass Spectrometry) spectroscopic methods, determined the structure of the synthesized compounds. MIC<sub>50</sub> (Minimum Inhibitory Concentration) values of the re-synthesized compounds against *Candida* species were evaluated by *in vitro* experiments. As a result of activity studies, it was found that compounds 4c and 4d showed significant activity. Compound 4d was found to be the most potent derivative against *Candida krusei* with a MIC<sub>50</sub> value of 1.95 µg / mL.

**Keywords:** Benzothiazole, Antifungal Activity, *Candida krusei*

\*\*\*

### Bazı Benzotiyazol Türevlerinin Antifungal Aktivitesinin Değerlendirilmesi

#### ÖZ

Hayvanlarda oluşan candida kaynaklı hastalıklara çözüm üretmek amacıyla daha önceden sentezi yapılmış bileşikler benzer metot kullanılarak tekrar sentezlenmiş ve antifungal etkinlikleri değerlendirilmiştir. Mevcut çalışmada, 10 tane benzotiyazol türevi bileşik (4a-4j), antifungal aktivitelerini değerlendirmek üzere yeniden sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapı tanımlamaları IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C-NMR ve HRMS (Kızılötesi Spektroskopi, <sup>1</sup>H Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi, <sup>13</sup>C Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi, Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi) spektroskopik yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yeniden sentezlenmiş bileşiklerin *Candida* türlerine karşı MIC<sub>50</sub> (Minimum İnhibitör Konsantrasyon) değerleri *in vitro* deneyler yapılarak değerlendirilmiştir. Yapılan aktivite çalışmaları sonucunda 4c ve 4d bileşikleri önemli aktivite göstermiştir. 4d bileşiğinin *Candida krusei*'ye karşı 1.95 µg / mL MIC<sub>50</sub> değeri ile güçlü bir türev olduğu bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Benzotiyazol, Antifungal Aktivite, *Candida krusei*

To cite this article: Osmaniye D, Sağlık B.N, Acar Çevik U, Eser M. Evaluation of Antifungal Activity of Some Benzothiazol Derivatives. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4):407-412.

Submission: 24.07.2019 Accepted: 17.09.2019 Published Online: 16.10.2019

ORCID ID; DO: 0000-0002-0499-436X, BNS:0000-0002-0151-6266, UAC:0000-0003-1879-1034, ME: 0000-0003-1542-298

\*Corresponding author e-mail: meser961@anadolu.edu.tr

## INTRODUCTION

There are many species of fungi including cutaneous (*Microsporium spp.*, *Trichophyton spp.*, *Epidermaphyton floccosum*, *Dermatophilus congolensis*), subcutaneous (*Rhinosporidium seeberi*, *Sporotrichum schenckii*) and systemic (*Aspergillus spp.*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma spp.*) that can cause infections in humans and animals. (Arda et al. 1999). Fungal infections can spread very quickly by direct contact, causing general condition disturbances in animals and deaths by generalized infections in young animals. Moreover, parasitic, viral, bacterial other infective agents cause secondary infections, which make the differential diagnosis of the disease more gruelling, and worsen the course of the disease. *Candida* species are taxonomically found in Fungi realm, Ascomycete branch, Saccharomycetes class, Saccharomycetales order, Saccharomycetaceae family and *Candida* genus. (Wilson 2019). Humans and animals such as cats, dogs, cattle, horses, sheep, goats, poultry, rodents and pigs are susceptible to infections (Edelmann et al. 2005). *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* (Pappas et al. 2018), *C. alopii*, *C. bovina*, *C. pseudotropicalis* in (Arda et al. 1999) especially *C. albicans* have been reported to cause diseases in animals and humans. (Pappas et al. 2018). In addition to these species, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, *C. dubliniensis* and *C. norvegensis* have also been reported to cause infections. (Sanguinetti et al. 2015). It has also been reported in many countries (Japan, India, Pakistan, England, Spain, Colombia, Venezuela, Panama, the United States) that *Candida auris* is transmitted by the nasocomial route and causes very serious infections in humans in recent years. (Pappas et al. 2018). Factors found in the skin and intestinal mucosa of healthy people (Pappas et al. 2018) cause invasive infections, especially in patients; where the immune system is suppressed and post-surgical operations. (Fidel et al. 1999, Perlin 2015). The diseases caused by fungi of the genus *Candida* are called Candidiasis. Although the term candidiasis means cutaneous, disease agents may affect the mucosa and organs. (Pappas et al. 2018). Even in healthy people, after gastrointestinal system operation or when the immune system is suppressed, the causative agents in the intestine can cross from the intestinal barrier to the blood, and cause serious infections in different organs such as brain, eye, bone marrow, lung, heart, liver, spleen, pancreas, kidney, peritoneum (Pappas et al. 2018). In animals, it has also been reported to cause infections in different organs such as mouth, oesophagus, stomach, intestines, skin, subcutaneous tissue, uterus, breast, testis (Arda et al. 1999). It is reported that the species and strains causing *Candida* infections in animals and humans do not differ genetically from each other. Factors that can be found in normal conditions in the oral cavity and intestines of healthy living organisms are thought to cause infections especially in

immunocompromised individuals and those animals can be a source for infections in such immunosuppressive individuals. (Edelmann et al. 2005).

The virulence and antifungal susceptibility of each species differ. Most of the clinical infections are revealed due to *C. albicans*. *Candida* spp., which are dispersed in the body-entangled blood, can cause many clinical symptoms. (Pappas et al. 2018).

*Candida albicans* has been reported to cause serious infections of the feet, footpad, nail and skin in dogs with *Malassezia spp.* (McEwan 2001). *Candida albicans* and some other *Candida* species have been identified in urinary tract infections in cats and dogs (Pressler et al. 2003, Jin and Lin 2005). It was reported that, *Candida glabrata* (together with *Fusarium oxysporum*) were isolated in a patient who started with foot soles and skin lesions and continued myocardial, liver, renal interstitium in dog (Rothenburg et al. 2017). In addition, *Candida albicans* was isolated from samples of internal organs of sepsis foals with new born necrotizing enterocolitis, renal insufficiency and incompatibility syndrome. Systemic infection has been identified to originate from this species (Reilly and Palmer 1994).

Echinocandin (micafungin, anidulafungin, caspofungin) and azole group drugs are most preferred drugs against fungal infections. However, these drugs may be ineffective in infections caused by *Candida* species, especially *C. glabrata*. (Sanguinetti et al. 2015; Pappas et al. 2018). Resistance to azoles has been reported in a dog diagnosed with urinary tract infection from *Candida tropicalis* (Álvarez-Pérez et al. 2016). It is also observed that *C. auris*, which is a newly identified global threat, is resistant to many drugs. (Pappas et al. 2018). Antifungal resistance between *Candida* species is terrifying (Perlin 2015). Therefore, it is necessary to discover new alternative drugs to be used in cases of candidiasis. The aim of this study was to introduce new antifungal drugs for potential clinical use.

## MATERIALS and METHODS

### Chemistry

The compounds previously synthesized and tested for anticancer activity were re-synthesized to evaluate their antifungal activity. All chemicals used in the syntheses were purchased either from Sigma-Aldrich Chemicals (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) or Merck Chemicals (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (Osmaniye et al. 2018).

### General procedure for the synthesis of target compounds (4a-4j)

Compounds 2-((5-substituted)benzothiazol-2-ylthio)acetohydrazide (3a, 3b) (0.002 mol) re-synthesized



according to the indicated method (Osmaniye et al. 2018) and reacted with suitable aldehydes (0.002 mol) in butanol (20 mL). After the completion of the reaction was judged by TLC, the reaction contents were cooled and the precipitated product was filtered off. The yield was increased by 3-5% in comparison with the method involving ethanol as solvent (Osmaniye et al. 2018).

### Analysis Studies

Melting degrees, IR, <sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR and HRMS spectra of the synthesized compounds were obtained and were found to be in agreement with the previous study. (Osmaniye et al. 2018). In addition, HMBC (Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy), HSQC (Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy) spectra for compound 4d were obtained and the structure determination of the compound was evaluated in detail.

### Antifungal Activity

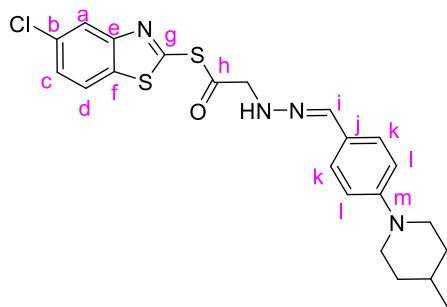
In vitro antifungal activity of all derivatives (4a-4j) was evaluated against *C. albicans* (ATCC 90030), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. krusei* (ATCC 6258) ve *C. parapsilosis* (ATCC 22019) at concentrations between 1 mg/mL–1.95 µg/mL. Activity studies were conducted following EUCAST protocol in accordance with previous studies reported by our research group (Karaburun et al. 2018, Karaburun et al. 2019).

## RESULT and DISCUSSION

### Chemistry

Compounds were re-synthesized as shown in Scheme-1. 4-fluorobenzaldehyde and secondary amine derivatives were reacted to obtain 4-substituted benzaldehyde derivatives (1a-1e). The 2-mercapto-5-substitutedbenzothiazole derivatives were refluxed with ethyl chloroacetate to obtain ethyl 2-(5-substitutedbenzothiazol-2-yl-thio)acetate derivatives. The obtained esters (2a, 2b) were reacted with excess of hydrazine hydrate to give hydrazide derivatives (3a, 3b). The hydrazide derivatives (3a, 3b) were reacted with 4-substituted benzaldehydes (1a-1e) in butanol and the reaction was performed with higher yield than the previously reported results.

### Analysis Studies

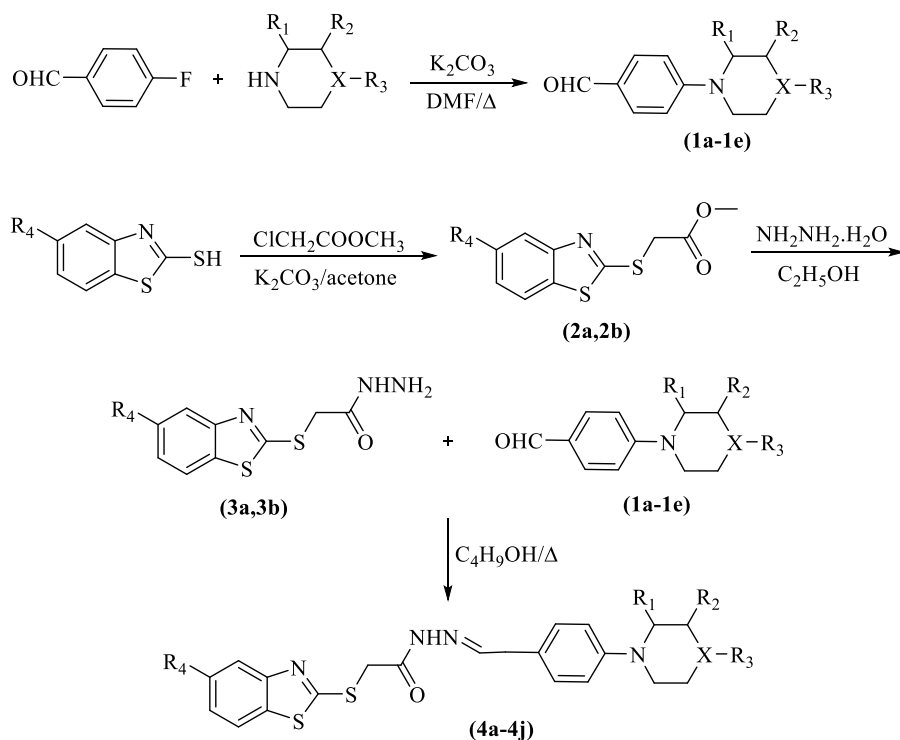


The melting points, IR, <sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR and HRMS spectra of the synthesized compounds were in agreement with the reported study. 2D-NMR technique was used to clarify the structure of the compounds. The two-dimensional NMR method is one of the most commonly used NMR techniques when one-dimensional NMR techniques cannot be used for precise structure determination. HSQC (Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy) and HMBC (Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy) are heteronuclear spectroscopy methods obtained from the correlation of protons in one axis and carbon spectrum in the other axes. HSQC provides information about the interactions between the carbon to which the proton is directly connected, while HMBC shows the interactions between hydrogen and carbon at a distance of 2 to 4 bonds. 2D NMR studies (HSQC, HMBC) were performed for the compound 4d i.e. the compound having the highest activity among the synthesized compounds (Figure 1 and Figure 2). In the light of the data obtained from HSQC, it was found that methyl group gave proton peaks at 0.90 ppm gave carbon peak at 22.19 ppm. The carbon of the piperidine group of which its hydrogens were resonated at 1.09-1.22 ppm and 1.63-1.67 ppm yielded peaks at 33.64 ppm. The carbon peak of the piperidine group attached to the methyl group, of which its protons resonated at 1.48-1.55 ppm was observed at 22.19 ppm. It was observed that the carbon peaks of the piperidine group, of which its protons at 2.68-2.75 ppm and 3.74-3.79 ppm, were observed at 48.20 ppm. The peak of methylene group carbon was observed at 35.79 ppm. Using HSQC data, it was found that the carbons coded a, c, k, l were resonated at 121.06 ppm, 124.86 ppm, 128.63 ppm and 152.47 ppm, respectively. In the light of the information obtained from HMBC, the carbons coded e, f, g, h, i, j and m were found to be 153.98 ppm, 131.65 ppm, 168.08 ppm, 148.18 ppm, 123.66 ppm and 152.47 ppm, respectively.

### Antifungal Activity

In vitro antifungal activities of all obtained compounds (4a-4j) were evaluated against four pathogenic fungi (*C. albicans* (ATCC 90030), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) according to the EUCAST protocol. Ketoconazole and fluconazole were used as reference drugs. The activity results obtained are presented in Table-1. The MIC<sub>50</sub> value of the compound 4c was observed as 7.81 µg / ml against *C. krusei*. Compound 4d were determined to have MIC<sub>50</sub> value of 1.95 µg/ml against *C. krusei*. This MIC<sub>50</sub> value is the same as the MIC<sub>50</sub> value of reference drugs. As a result of the activity studies, it was found that compounds carrying chlorine substituents (4c, 4d) on the benzothiazole ring were more effective than the compounds bearing methoxy substituent (4h, 4i) on the benzothiazole ring.





Scheme 1. Synthesis pathway of target compounds

Bileşik	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	X	%Verim
4a	-H	-H	-H	-Cl	-CH	86
4b	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-Cl	-CH	83
4c	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-Cl	-CH	85
4d	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-Cl	-CH	88
4e	-H	-H	4-methoxyphenyl	-Cl	-N	82
4f	-H	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-CH	85
4g	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-OCH <sub>3</sub>	-CH	82
4h	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-CH	85
4i	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-CH	82
4j	-H	-H	4-methoxyphenyl	-OCH <sub>3</sub>	-N	85

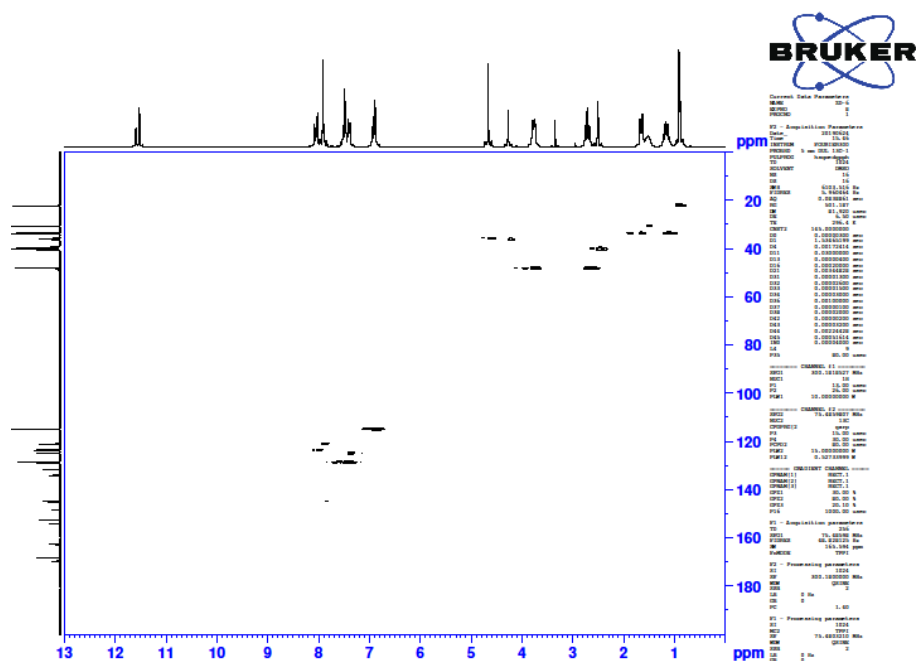


Figure 1. HSQC spectra of compound 4d.

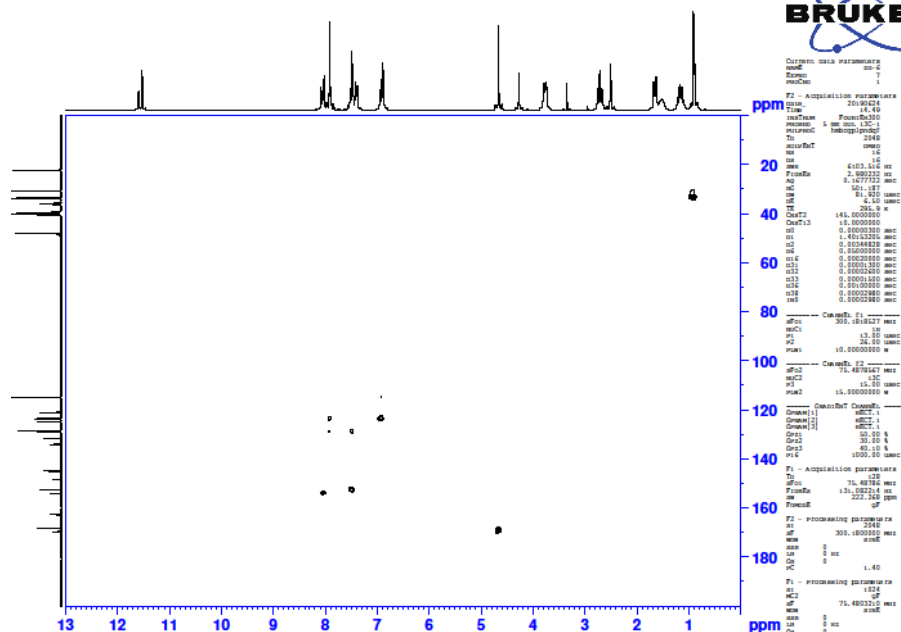


Figure 2. HMBC spectra of compound 4d

Table 1. MIC<sub>50</sub> (µg/mL) values of compounds 4a-4j and reference drugs.

Comp.	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>
4a	>1000	>1000	>1000	>1000
4b	>1000	>1000	>1000	>1000
4c	>1000	125	7.81	>1000
4d	>1000	125	<b>1.95</b>	>1000
4e	>1000	>1000	>1000	>1000
4f	>1000	>1000	>1000	>1000
4g	>1000	>1000	>1000	>1000
4h	>1000	>1000	>1000	>1000
4i	>1000	>1000	>1000	>1000
4j	>1000	>1000	>1000	>1000
Ketoconazole	0.98	1.95	1.95	1.95
Fluconazole	0.98	1.95	1.95	0.98

## CONCLUSION

In summary, 10 benzothiazole-hydrazone derivatives that were synthesized previously were re-synthesized for their potential utilisation in candidal infections in animals and their in vitro antifungal activities were evaluated. Structure elucidation of the synthesized compounds was performed using spectroscopic methods (IR, <sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR, HRMS) and it was found to be in agreement with the previous study. In addition, structure determination was completed using 2D NMR technique (HMBC, HSQC). As a result of the activity studies, it is found that compound 4d was the most active derivative in the series with MIC<sub>50</sub> value of 1.95 µg/ml. This information suggests that derivatives carrying chlorine substituents on benzothiazole are more active than derivatives bearing methoxy substituents, and the

methyl group at position 4 of the piperidine ring contributes to activity.

## REFERENCES

- Álvarez-Pérez S, García ME, Cutuli MT, Fermín ML, Daza MÁ, Peláez T, Blanco JL. Acquired multi-azole resistance in *Candida tropicalis* during persistent urinary tract infection in a dog. *Med Mycol Case Rep.* 2016; 11: 9-12.
- Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS. Özel Mikrobiyoloji, Medisan Yayın, Ankara. 1999; pp. 309-341.
- Edelmann A, Krüger M, Schmid J. Genetic relationship between human and animal isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(12): 6164-6166.
- Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(1): 80-96.

- Jin Y, Lin D.** Fungal urinary tract infections in the dog and cat: a retrospective study (2001–2004). *J Am Anim Hosp Assoc.* 2005; 41(6): 373-381.
- Karaburun AC, Acar Çevik U, Osmaniye D, Sağlık BN, Kaya Çavuşoğlu B, Levent S, Özkay Y, Koparal AS, Behçet M, Kaplancıklı ZA.** Synthesis and Evaluation of New 1,3,4-Thiadiazole Derivatives as Potent Antifungal Agents. *Molecules.* 2018; 23(12): 3129.
- Karaburun AC, Kaya Çavuşoğlu B, Acar Çevik U, Osmaniye D, Sağlık BN, Levent S, Özkay Y, Atlı Ö, Koparal AS, Kaplancıklı ZA.** Synthesis and Antifungal Potential of Some Novel Benzimidazole-1,3,4-Oxadiazole Compounds. *Molecules.* 2019; 24(1): 191.
- McEwan NA.** Malassezia and Candida infections in bull terriers with lethal acrodermatitis. *J Small Anim Pract.* 2001; 42: 291–297.
- Osmaniye D, Levent S, Karaduman AB, Ilgın S, Ozkay Y, Kaplancıklı ZA.** Synthesis of New Benzothiazole Acylhydrazones as Anticancer Agents. *Molecules.* 2018; 23: 1054.
- Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ.** Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4: 18026.
- Perlin DS.** Echinocandin resistance in Candida. *Clin Infect Dis.* 2015; 61: 612-617.
- Pressler BM, Vaden SL, Lane IF, Cowgill LD, Dye JA.** Candida spp. urinary tract infections *Assoc.* 2003; 39: 263–270.
- Reilly LK, Palmer JE.** Systemic candidiasis in four foals. *J Am Vet Med Assoc.* 1994; 205(3): 464-466.
- Rothenburg LS, Snider TA, Wilson A, Confer AW, Ramachandran A, Mani R, Nafe L.** Disseminated phaeohyphomycosis in a dog. *Med Mycol Case Rep.* 2017; 15: 28-32.
- Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C.** Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses.* 2015; 58: 2-13.
- Wilson D.** Candida albicans. *Trends in Microbiology.* 2019; 27(2): <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.010>

## Allergen Determination with Detection of Serum Specific IgE in Dogs with Atopic Dermatitis from Samsun and Vicinity

Öykü BARILI<sup>1\*</sup>, Didem PEKMEZCİ<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>University of Ondokuz Mayıs, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Kurupelit, Samsun, Turkey

### ABSTRACT

It is aimed to detect allergen determination via serum specific immunoglobulin E (IgE) for the first time in dogs diagnosed as Atopic Dermatitis (AD) from Samsun and vicinity within this present study. Twenty one dogs with different age, breed and gender diagnosed with AD based up on the Favrot's criteria. Serum samples of the dogs were analyzed by detection of serum specific IgE for determination of 20 different allergens. The effects of gender, age and the feeding routes for those 20 different allergens separately were analyzed. Based up on the grading of the allergens detected in 21 dogs with AD from Samsun and vicinity; results reflects that *Dermatophagoides farinae* was stated as first degree within a very high seropositivity rate (95%). Moreover, in varying degree of seropositivity rates of other allergens were also detected. Females showed statistically ( $p<0.05$ ) higher positivity rate to the 20<sup>th</sup> allergen, *Ctenocephalides* spp. more than males. Furthermore, we did not found any significant effects of age and feeding routes on the allergens in the dogs with AD ( $p>0.05$ ). Dogs with AD from Samsun and vicinity had very high serum specific IgE levels against to the house dust and storage mites.

**Keywords:** Allergen, Atopic dermatitis, Dog, Samsun, Specific IgE

\*\*\*

### Samsun İli ve Çevresindeki Atopik Dermatitisi Köpeklerde Serum Spesifik IgE Tespiti ile Alerjen Tayini

#### ÖZ

Bu çalışma ile Samsun ili ve çevresindeki Atopik Dermatitisi (AD)'li köpeklerde ilk kez serum spesifik immunoglobulin E (IgE) ile alerjen profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Değişik ırk, cinsiyet ve yaşlardaki 21 adet köpeğe Favrot Kriterleri ile AD teşhisi konulmuştur. Köpeklerle ait serum örnekleri serolojik olarak 20 farklı alerjene spesifik IgE yönünden incelenmiştir. AD'li köpeklerde 20 farklı alerjenin görülme oranlarına cinsiyet, yaş ve beslenme şekillerinin etkisi araştırılmıştır. Samsun ili ve çevresindeki AD'li köpeklerdeki farklı alerjen profilleri arasında en yüksek %95 oranında ev tozu akarı *Dermatophagoides farinae* seropozitifliği saptanmıştır. Bununla birlikte köpeklerde farklı oranlarda diğer alerjenlere yönelik seropozitiflik saptanmıştır. Dişi köpeklerde erkek köpeklerle oranla sadece *Ctenocephalides* spp. seropozitifliğinin yüksek olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Bununla birlikte AD'li köpeklerde yaş ve beslenme şekillerinin alerjen görülme sıklığına etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ). Samsun ili ve çevresindeki AD'li köpeklerde ev tozu ile depo akarlarının serum spesifik IgE değerlerinin çok yüksek oranlarda pozitiflik verdiği saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Alerjen, Atopik dermatitis, Köpek, Samsun, Spesifik IgE

To cite this article: Barılı Ö, Pekmezci D. Allergen Determination with Detection of Serum Specific IgE in Dogs with Atopic Dermatitis from Samsun and Vicinity. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4):413-423.

Submission: 01.08.2019 Accepted: 08.10.2019 Published Online: 01.11.2019

ORCID ID; ÖB: 0000-0001-7692-5171, DP: 0000-0003-2072-8165

\*Corresponding author e-mail: oykudoyran@hotmail.com

## GİRİŞ

Yakın zamanda yapılan çalışmalar Köpeklerde Atopik Dermatit'in (KAD) genellikle diğer kaşıntılı hastalıklarla ilişkili kompleks bir hastalık olduğunu göstermektedir. Bu sebepten dolayı ve KAD doğru teşhis edebilecek bir deri alerji testi eksikliği nedeniyle ve diğer kaşıntılı dermatozlarla karşılaşılabilirliğinden dolayı Favrot kriterlerinin tam anlamıyla uygulanmış ve ekarte edilmiş olması gerekmektedir (Favrot ve ark. 2010). Köpek AD'nin klinik tanısı potansiyel alerjenlerin alerji testleriyle belirlenip, etken eliminasyonu, bu söz konusu olmaz ise desensitizasyon denemelerine geçilmelidir. Geleneksel olarak AD'nin tedavisinde kullanılan immun supresif ajanların potansiyel yan etkileri, maliyetleri ve hasta sahiplerinin tatmin olamamaları bu ilaçların kullanımlarını dolayısı ile de hastaların tedavilerini kısıtlamaktadır. Bundan dolayı klinik olarak AD teşhisi konulan köpeklerde serum spesifik IgE ile allerjenlerin belirlenmesi tedavinin en önemli ayağını oluşturmaktadır (Kang ve ark. 2014).

Ayrıca, hastalığın bazı yönleri KAD ile ilgili olmayan diğer deri hastalıklarını taklit edebilmektedir. Köpeklerde ise AD'in patofizyolojisinde rol alan alerjenler arasında ev tozu akarları, bitkiler, arthropodlar, epiteller, gıdalar ve küf mantarlarının bulunduğu bildirilmektedir (Halliwell ve ark. 1972, Jeffers ve ark. 1991, Rosser 1993). Bazı alerjenlerin çevreye özgü olduğu kabul edilmekle beraber, bazılarının iklim ve/veya coğrafi konuma göre de değişebileceği artık günümüzde ortaya konulmuştur. Önemli olan nokta ise bir coğrafi bölgenin veya ülke için geçerli alerjen profilinin farklı coğrafi konumda bulunan ülkeler için önem ihtiva etmeyebileceğidir. Bu nedenledir ki köpeklerin yaşadıkları coğrafi bölgelere özgü alerjenlerin tespiti son derece önem arz etmektedir.

Veteriner dermatolojide KAD'e klinik olarak neden olan önemli alerjen tayinlerinde teşhis metodları çok hızlı bir şekilde ilerlemektedir. İntradermal Deri Testleri (IDT) ve in vitro antijen-spesifik IgE gibi testler yakın geçmişte köpek hastalarımız için üretilmeye başlamıştır (Nesbitt ve ark. 1984, Sousa ve Norton 1990). Her ne kadar IDT 1990'lı yılların başlarında köpek AD'nin tedavisinin yönetiminde "Altın Standart" olarak kabul görmüş olsa da teste kullanılan ekstraktların histamin benzeri substratlar ile kontaminasyonun yanlış pozitiflik ve/veya yanlış negatiflik ve alerjenler arası çapraz reaksiyon verme ihtimali testin güvenilirliğini sorgulatur olmuştur (Codner ve Tinker 1995). Yanlış negatif reaksiyonlar ise enjeksiyon tekniğindeki subjektif hatalara bağlı olarak, alerjen solüsyonun doğru konsantrasyonlarda kullanılmamasına ve köpeğin o dönemdeki immun durumu ile kullanılan ilaçlara bağlı olarak değişmektedir (Nesbitt ve ark. 1984). Bundan dolayı tıpkı beşeri hekimlikte olduğu gibi günümüzde

veteriner dermatoloji alanında in vitro olarak çalışılan diyagnostik kitlerin sayıca artması umut vericidir. Son on senede tür spesifik olarak geliştirilen bu kitlerin artık validasyonları da kabul görmektedir.

Alerjenlerin coğrafi koşullarda farklı dağılım göstermesi de o bölgede yaşayan bireyler için önemlidir. Benzer durum veteriner pratik için de geçerlidir. Bundan dolayı bu çalışma ile Samsun ili ve çevresindeki KAD'li köpeklerde ilk kez serum spesifik IgE ile alerjenlerinin belirlenerek bölgedeki KAD'li köpeklerin tedavisine katkı sağlaması ve diğer sağlıklı köpeklerin belirlenen alerjenlere maruz kalmalarının önüne geçilmesi amaçlanmaktadır.

## MATERYAL ve METOT

### Hayvan Materyali

Hayvan materyalini Nisan 2017 ile Nisan 2018 tarihleri arasında Samsun ve çevresinden kaşıntı şikâyeti ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesine tedavi veya kontrol amacıyla getirilen ancak son 1 ay içerisinde mevcut şikâyetine yönelik herhangi bir tedavi yapılmamış, sahipli, çeşitli ırk, cinsiyet ve yaşlardaki, klinik olarak AD teşhisi konulmuş 21 adet köpek oluşturmuştur. Çalışma yerel hayvan etik kurulunca onaylanmıştır (2016/63). Aynı zamanda hasta sahiplerinden imzalı hasta onam formları alınmıştır. Köpeklerin ırk, yaş ve cinsiyetleri ile getirildikleri bölgelere ait bilgiler kayıt edilmiştir ve sonrasında detaylı klinik muayeneleri gerçekleştirilmiştir. Köpeklerin yapılan fiziksel muayenelerinde dermatolojik muayene formları doldurularak kayıt altına alınmıştır. Tüm fiziksel muayenelerin sonrasında alerjenlere karşı serum spesifik IgE düzeylerinin belirlenmesi amacıyla vena cephalica antebraçhi'den 5 ml jelli tüplere kan alınarak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Serumlar iki farklı ependorf tüpüne aktarılmış ve çalışılana kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### Deri Kazıntı Muayenesi

AD şüphesi taşıyan köpeklerin lezyonlu bölgelerinden derin kazıntı örnekleri lama konularak %10'luk KOH'te oda ısısında 15 dakika bekletilmiş ve mikroskop altında *Demodex* spp./*Sarcoptes canis* yönünden incelenmiştir. *Demodex* spp./*S. canis* pozitif hastalar çalışmaya dâhil edilmemiştir.

### Atopik Dermatit Teşhis Kriterleri

Köpeklerin detaylı anemnez, fiziksel ve dermatolojik muayenelerinin (mevcut dermatolojik lezyonlar buldukları bölgeler doğrultusunda şematize edilmiştir) ardından "Atopik Dermatit" teşhisi Favrot ve ark. (2010)'da belirtilen kriterler dâhilinde konulmuştur. Hasta sahiplerine aynı zamanda hastalar ile ilgili detaylı bilgilere ulaşılması amacıyla sorular yöneltilmiş ve cevapları kayıt altına alınmıştır.

### Serum Spesifik IgE ile Alerjen Tespiti

Klinik olarak AD teşhisi konulan 21 köpek serumu 20 farklı alerjen içeren Polycheck® Canis (Münster, Germany) alerji tanı kiti ile incelenmiştir. Test kitinde her bir kasette bulunan 20 farklı alerjen Tablo 1’de sunulmuştur. Test prosedürü üretici firmanın direktifleri doğrultusunda çalışılmıştır. Test prosedürüne uygun olarak çalışılan kasetler, üretici firmanın sunduğu yazılımın yüklü olduğu bilgisayardaki tarayıcıda taranmış ve sonuçlar her bir köpek için ayrı ayrı yazdırılmıştır. Her bir alerjen için serum spesifik IgE konsantrasyonları (kU/l) otomatik olarak yazılım dâhilinde aşağıdaki gibi skorlanmıştır.

**Skor 0** (<0,5 kU/l) =negatif

**Skor 1** (0,5-2,0 kU/l) =hafif/zayıf

**Skor 2** (2,0-20 kU/l) =belirgin

**Skor 3-4** (>20 kU/l) =kuvvetli

### İstatistiksel Değerlendirme

AD’li köpeklerde cinsiyet, yaş ve beslenme şekillerinin alerjenlerin görülme oranlarına etkisinin karşılaştırmalarında Ki-kare testi kullanılmıştır.  $p<0,05$  değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Tüm analiz ve hesaplamalarda SAS (2013) programı kullanılmıştır.

## BULGULAR

Çalışmaya dâhil olan değişik ırk, cinsiyet ve yaşlardaki 21 adet köpeğe ait veriler Tablo 2’de verilmiştir. Köpeklerin dermatolojik problemlerinin dışında eşlik eden başka bir probleminin olmadığı belirlenmiştir. AD’li köpeklerin dermatolojik lezyonlarının tanımlanması Tablo 3’te gösterilmiştir. AD teşhisi sonrasında serum spesifik IgE tayini ile köpeklerde ortaya konulan alerjen profilleri değişik derecelerde pozitiflik vermiştir (Tablo 4). Alerjenlerin pozitiflik oranları testin sonuçlarının önerilen program dâhilinde taranması sonucunda otomatik olarak hesaplanmıştır. Her bir köpeğe ait alerjen skorlanması ayrı ayrı rapor edilmiştir. Diğer taraftan alerjenlerin 21 köpektaki görülme oranlarının farklılıkları (Şekil 1) ise istatistikî olarak anlamlı ( $p<0,01$ ) bulunmuştur. Buna göre 20 alerjen içinden çalışma materyalini oluşturan 21 AD’li köpekte birinci sırada %95 görülme oranı ile ev tozu akarlarından *D. farinae* yer almaktadır. İkinci sırada yine ev tozu akarlarından olan *D. pteronyssinus* %76 oranında yer alırken, 3. sırada %71 oranı gıda akarlarından *A. siro* ile 4. sırada %61 oranı ile yine gıda akarı olan *Tyrophagus* yer almaktadır. Yirmi alerjen içinde %47 oranında en sık 5. olarak görülen *Lepidoglyphus*, *Ryepollen*, *Grass-Mix* alerjenleri yer almıştır. Altıncı sırada %38 oranında muz familyası bitki polenlerinden *Plantain* ve kuzukulağı poleni olan *Sorrel* ile *Ctenocephalides* spp. yer almaktadır. Gürgen familyası ağaç polenlerinden *Birch/Alder/Hazel* %33 görülme oranları ile çalışmada en çok 7. alerjen grubunu oluşturmuşlardır. Söğüt familyası ağaçların polenleri (*Plantane/Willow/Poplar*), ısırgan otu poleni

(*Stinging nettle*) ile albüm otu poleni (*Lambs quarter*) %19 görülme oranı ile 8. sırada yer almışlardır. Dokuzuncu sırada yer alan pelin otu poleni olan *Mugwort* %14 oranında AD’li köpeklerde görülmüştür. Üç numaralı alerjen olan *Malessezia* ile 7 numaralı alerjen olan saman nezlesi poleni *Ragweed (Ambrosia)* %9,5 görülme oranı ile 10. sırada yer almıştır. Son olarak 11. sırada sadece bir köpekte görülen %4,8 oranı ile *Aspergillus/Penicillium* ve yapışkan otu poleni olan *Parietaria (Wall pellitory)* yer almaktadır. Altı numaralı alerjen olan klado küfü *Alternaria/Cladosporium* ise çalışma köpeklerinin hiçbirinde pozitiflik vermemiştir. AD teşhisi konulmuş 21 vakanın 12’sini dişi, 9’unu da erkek köpek oluşturmuştur (Tablo 4). Köpeklerdeki cinsiyete bağlı alerjen görülme olasılıkları her farklı alerjen için ayrı ayrı araştırılmış olup, sadece 20. alerjen olan *Ctenocephalides* spp.’nin dişi köpeklerde görülme oranının erkek köpeklere oranla istatistikî olarak ( $p<0,05$ ) daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Diğer alerjenlerin cinsiyet bazında görülme oranlarında istatistikî olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ).

Çalışmamız köpeklerinden en küçüğü 1,5 yaş iken en büyüğü 17 yaşında olup ortalama 5,2 yaşdır. Ancak yaş farklılıklarına göre alerjen görülme sıklıkları bakımından yapılan karşılaştırmada AD teşhisinde kullandığımız Favrot kriterlerince 2 yaş grubu olan 3 yaş altı ve 3 yaş üstü grupları değerlendirmeye alınmıştır. Bu bağlamda 3 yaş altı grubunu 9 adet köpek oluştururken, 3 yaş üstü grubu 12 adet köpek oluşturmuştur (Tablo 2). Üç yaş altı ve 3 yaş üstü gruplarının 20 farklı alerjeni gösterme olasılıkları değerlendirilmiş ancak gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Hasta sahiplerinden alınan bilgiler doğrultusunda AD teşhisi konulmuş 21 köpeğin 9’u sadece kuru mama (K) ile beslenirken, 11 köpeğin kuru mama ve ev yemekleri (KE) ile beslendiği öğrenilmiştir. Sadece 1 köpeğin ise yalnızca ev yemekleri (E) ile beslendiği tespit edilmiştir. Sadece ev yemekleri ile beslenen 1 köpek veri setine dâhil edilmemiştir. K ve KE grupları arasında beslenme şekillerine bağlı alerjen görülme olasılıkları her farklı alerjen için ayrı ayrı araştırılmış ve gruplar arasında istatistiksel bir farklılık tespit edilememiştir ( $p>0,05$ ).

Bununla beraber 20. alerjen olan *Ctenocephalides* spp. için K grubunun KE’ye göre sınırda önemlilik ( $p>0,08$ ) gösterdiğini ancak bu durumun istatistiksel olarak bir öneminin olmadığı sonucuna varılmıştır.

**Tablo 1.** Polycheck® Canis (Münster, Germany) Alerji Tanı Kitlerine ait 20 adet farklı alerjen

**Table 1.** Twenty different allergens belong to the Polycheck® Canis (Münster, Germany) Allergy Diagnostic Kit

Alerjen No	Alerjen Adı	Alerjenlerin Geleneksel İsimleri
1	<i>D.farinae</i>	Ev Akarı Tip-1
2	<i>D.pteromyssinus</i>	Ev Akarı Tip-2
3	<i>Malassezia</i>	Malessezia
4	<i>Lepidoglyphus</i>	Gıda Paraziti
5	<i>Aspergillus/ Penicillium</i>	Aspergillus/ Penicillium
6	<i>Alternaria/ Cladosporium</i>	Klado Küfü
7	<i>Ragweed (Ambrosia)</i>	Saman Nezlesi Poleni
8	<i>Birch/ Alder/ Hazel</i>	Gürgen Familyası Ağaçların Polenleri
9	<i>Plantane/ Willow/ Poplar</i>	Söğüt Familyası Ağaçların Polenleri
10	<i>Parietaria (Wall pellitory)</i>	Yapışkan Otu Poleni
11	<i>Ryepollen</i>	Çavdar Poleni
12	Grass-Mix	Çimen/Ot Tiplerinin Polenleri*
13	<i>Stingingnettle</i>	Isırgan Otu Polenleri
14	<i>Lambsquarter</i>	Albüm Otu Poleni
15	<i>Plantain</i>	Muz Familyası Bitki Polenleri
16	<i>Mugwort</i>	Pelin Otu Poleni
17	<i>Sorrel</i>	Kuzukulağı Poleni
18	<i>Acarus siro</i>	Bitki Akarı
19	<i>Tyrophagus</i>	Un Akarı
20	Flea ( <i>Ctenoceph.</i> )	Pire

\*Çimen/Ot Tipleri: Domuz ayrığı (Parmak otu), Güz Çiğdemi, Delice Otu, Çayır üçgülü (Çayır otu),Orman Salkımı, Kadife çimi

**Tablo 2.** AD teşhisi konulmuş 21 adet köpeğin ırk, cinsiyet ve yaşlarına ait veriler

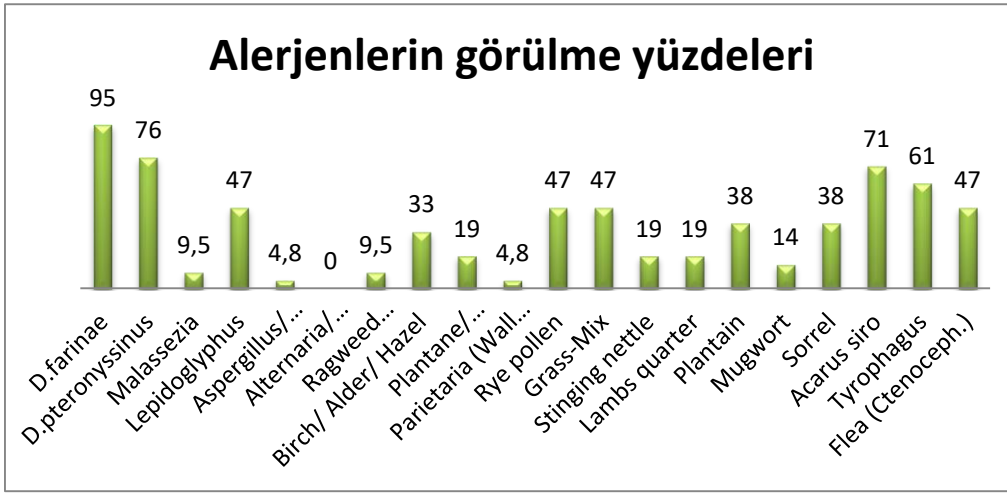
**Table 2.** Data of breed, sex and ages belong to the 21 dogs diagnosed with AD

Vaka Numarası	İrk	Cinsiyet	Yaş
1	G	Dişi	10
2	G	Dişi	11
3	T	Erkek	1,5
4	H	Erkek	9
5	T	Erkek	4
6	CC	Erkek	1,5
7	D	Dişi	3,5
8	P	Dişi	4
9	PB	Dişi	5
10	M	Dişi	3
11	D	Erkek	2,5
12	M	Dişi	4
13	P	Erkek	17
14	B	Dişi	8
15	BM	Dişi	2
16	KCS	Erkek	9
17	G	Dişi	8
18	JR	Erkek	2
19	T	Dişi	2
20	K	Dişi	2
21	T	Erkek	1

**G:** Golden Retriever; **T:** Terrier; **H:** Husky; **C:** Chow Chow; **D:** Doberman; **P:** Pug; **PT:** Pitt Bull; **M:** Melez; **PK:** Pekinese; **B:** Boxer; **BM:** Belçika Malonesi; **KCS:** King Charles Spaniel; **JR:** Jack Russell; **K:** Kangal







**Şekil 1.** AD teşhisi konulmuş 21 adet köpeğe ait 20 farklı alerjenlerin pozitiflik yüzde (%) oranları. Farklılıklar istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur,  $p < 0,01$ .

**Figure 1.** Seropositivity rates of the 20 different allergens belong to the 21 dogs diagnosed with AD. Differences were found as statistically significant,  $p < 0.01$ .

## TARTIŞMA

Köpeklerde AD'e neden olan alerjilerin tespiti, yatkın olan köpek ırkları ve bunların tedavileri gibi literatürde sayısız çalışma mevcuttur. Ancak bu çalışmaların hiç biri sadece bir ırka özgü alerjen profilini ortaya koyma yönünde istikrarlı olamamıştır. Bu durumun bir nedenini ise AD'li köpeklerde yaygın alerjen profilini ortaya koyma yönündeki çalışmalarda da köpek ırklarının istatistiksel hesaplamaya yetecek kadar eşit sayıda dağılım gösterememesi yer almaktadır. Bu durum çalışmamız materyalini oluşturan köpek ırklarımız için de geçerlidir. Öyle ki 14 farklı ırk grubundan hiç birinde istatistiksel analize uygun denek sayısına ulaşamamıştır. Ancak 20 numaralı Kangal ırkı köpeğimizin 20 farklı alerjen profili değerlendirilmesinden 16 farklı alerjene aynı anda pozitiflik vererek çalışmayı oluşturan 21 köpekten en fazla alerjene reaksiyon veren ırk olduğunu söyleyebiliriz. Bununla beraber, ülkemizdeki AD'li köpeklerde IDT ile alerjen profillerini ortaya koyan çalışma kapsamında da Kangal ırkının yer aldığını görmekteyiz (Temizel ve Aytug 2011). Kim ve ark. (2011) yılında KAD'li köpeklerdeki alerjen profilini IDT ile ortaya koydukları çalışmalarında 58 köpeğin çoğunluğunu Maltase ve Shih-tzu ırklarının oluşturduğunu ancak, bu sonucun Kore'deki hayvan sahiplerinin evde bakılması kolay olan bu ırkların tercih edilmelerine bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceğini belirtmişlerdir.

Zur ve ark. (2002) yılında retrospektif olarak gerçekleştirdikleri çalışmada Kaliforniya Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne 1992-1998 yılları arasında bakılan 266 adet AD'li köpek arasında Labrador Retriever, Golden Retriever, West Highland White Terrier, English Springer Spaniel, Chinese Shar-Peis, Bull Terrier, Bichon Frisés ve Tibetan Terrier ırkları diğerlerine göre istatistiksel

olarak yüksek oranda AD'e sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı zamanda Labrador Retriever, Golden Retriever, West Highland White Terrier ırkı köpekler Ihrke ve ark. (1985)'nin çalışmalarında da en sık AD teşhisi konulan köpek ırklarını oluşturmuşlardır.

AD'li köpeklerde ırk farklılıklarının belirlenmesindeki kısıtlamalar cinsiyet farklılıklarında da ortaya çıkmaktadır. Bu konuda cinsiyet farklılıklarının AD şekillendirme potansiyellerine özgü çalışmaların sayısı veteriner pratikte oldukça azdır.

Çevresel ve diyet ile ilgili farklılıkların KAD'i oluşturma ihtimallerini inceleyen çalışmalar cinsiyet, doğum sezonu, çevre (ev, coğrafya ve diğer hayvan temaları), aşılama ve anti paraziter tedavi uygulamalarının KAD'i oluşturma ihtimallerini açıklayan çalışmaların önüne geçilmektedir (Nødtvedt ve ark. 2007). İsviçre'deki Boxer, Bullterrier ve West Highland köpek ırklarında AD görülmesine yönelik risk faktörlerinin incelendiği vaka kontrollü meta analiz çalışmasının ana bulgusu olarak araştırmacılar ev yemekleri ile beslenen gebe köpeklerin yavrularında AD'in ortaya çıkma olasılığının diğerlerine nazaran daha düşük olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu bağlamda, KAD'in görülmesine neden olabileceği cinsiyet faktörünün araştırıldığı çalışmalarda tutarsızlıklar bulunmaktadır ve günümüzde de halen bu sorun netliğe kavuşmuş değildir. Örneğin, bir çalışmada erkek köpeklerde KAD görülme ihtimalinin yüksek olduğu bildirilirken (Nesbitt 1978), farklı çalışmalarda dişi köpeklerde bu yatkınlığın daha fazla olduğu belirtilmiştir (Halliwell ve ark. 1972, Scott 1981, Nesbitt ve ark. 1984). Diğer taraftan cinsiyet farklılıklarının KAD gelişiminde önemsiz olduğunu belirten çalışmalar da literatürde mevcuttur (Willemse ve van den Brom 1983, Carlotti ve Costargent 1992, Saridomichelakis ve ark. 1999).

Bu çalışmada ise 21 KAD'li köpeğin 12'sinin dişi, 9'nun da erkek olduğu tespit edilmiştir. Köpeklerdeki cinsiyete bağlı alerjen görülme olasılıkları her farklı alerjen için ayrı ayrı araştırdığımızda sadece 20. alerjen olan *Ctenocephalides* spp.'nin dişi köpeklerde görülme oranının erkek köpeklerle oranla daha fazla olduğu ( $p<0,05$ ) tespit edilirken diğer alerjenlerin cinsiyet bazında görülme oranlarında istatistiki olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Bu bakımdan sonuçlarımızın bazı çalışmalar (Halliwell ve ark. 1972, Scott 1981, Nesbitt ve ark. 1984) ile örtüşmekle beraber bu çalışmaların hepsinin IDT ile yapıldığının belirtilmesi gerekmektedir. Çoğu çalışmada alerjen profillerinin cinsiyete bağlı olarak değişmediğini, her iki cinsiyette de alerjenlerin görülme oranlarının benzerlikler taşıdıkları belirtilmiştir. Öte yandan Zur ve ark.(2002) dişi köpeklerin çim ve insekt alerjenlere pozitiflik verme oranlarının erkeklerle oranla daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuç, çalışmamızdaki dişi köpeklerin sadece *Ctenocephalides* spp.'nin görülme oranlarının erkeklerle göre istatistiksel olarak daha fazla olduğu sonucu ile de örtüşmektedir.

Öte yandan cinsiyet farklılıklarının önemini araştıran çalışmalarda köpeklerin kısırlaştırılma veya kastrasyon durumlarının da değerlendirilmeye alınması gerekliliği vurgulanmaktadır.

Genel olarak KAD'in başlangıç yaş aralığı tipik olarak 6 ay ile 3 yaş arasında değişmektedir. Klinik bulguların ise 6 aylıktan küçük ve 7 yaşından büyük köpeklerde görülmediği düşünülmektedir (Nesbitt ve ark. 1984, Scott ve ark. 1995, Saridomichelakis ve ark. 1999, Griffin ve DeBoer 2001). Aslında genç köpeklerde AD görülme olasılıkları diğer dermatolojik problemlerin görülme olasılıklarından daha yüksektir (Prelaudve ark. 1998). Yine Zur ve ark. (2002) KAD'li köpeklerin yaş ortalamalarının 1,6 olduğunu, fakat yaşın alerji görülme oranlarına bir etkisinin olmadığını savunmuşlardır.

Çalışmamızdaki köpeklerin en küçüğü 1,5 en büyüğü 17 yaşında olup yaş ortalaması 5,2 olarak tespit edilmiştir. Ancak yaş farklılıklarına göre alerjen görülme sıklıkları bakımından yapılan karşılaştırmada AD teşhisinde kullandığımız Favrot kriterlerince 2 yaş grubu olan 3 yaş altı ile 3 ve üstü yaş grupları değerlendirmeye alınmıştır. Bu bağlamda, 3 yaş altı grubunu 9 adet köpek oluştururken, 3 yaş ve üstü grubu (3 yaş dâhil olmak üzere) 12 adet köpek oluşturmuştur. Üç yaş altı ve 3 yaş ve üstü gruplarının 20 farklı alerjeni gösterme olasılıkları değerlendirilmiş ancak gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunamamıştır. Bu bağlamda mevcut sonuçlarımız diğer çalışmalar ile örtüşmektedir (Willems ve ark. 1984, Scott ve ark. 1995, Zur ve ark. 2002, Kang ve ark. 2014). Kim ve ark. (2011) ise 58 AD'li köpekte alerjen profillerini belirledikleri çalışmada köpeklerin yaş ortalamalarının 4,8 olduğunu ve %70 oranında

linik bulgu gösterme eğiliminde olanların 3 yaş ve altında olduklarını belirtmişlerdir.

Ayrıca, sadece ev yemekleri ile beslenen 1 köpek dışındaki, kuru mama ve kuru mama/ev gıdası grubunu oluşturan köpeklerde beslenme şekillerine bağlı alerjen görülme olasılıkları her farklı alerjen için ayrı ayrı araştırılmış olup gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunamamıştır. Bununla beraber 20. alerjen olan *Ctenocephalides* spp. için kuru mama grubunun kuru mama/ev gıdası grubuna göre sınırdan önemlilik ( $p>0,08$ ) gösterdiğini ancak bu durumun istatistiksel olarak bir öneminin olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu bağlamda önceki literatürlerde beslenme şekilleri ile pire alerjenine pozitiflik gösterme ihtimalleri dikkate alınmamış olup bu durum ilk kez mevcut çalışmamızla ortaya konulmuştur.

Çalışmamızdaki serum spesifik IgE test sonuçları ev tozu akarlarının *D. farinae* ve *D. pteronyssinus*'un sırası ile %95,2 ve %76,1 ile diğer alerjenlere göre en çok görülen alerjenler olduğunu göstermiştir. Ev tozu akarlarının benzer şekilde insanlar için de en çok karşılaşılan alerjenler olduğu bilinmekle (De Weck 1995, Hill ve DeBoer 2001) beraber Samsun ili sınırları içerisindeki ev ve iş yerlerinin toz faunaları içinde ev tozu akarlarından *D. farinae* ve *D. pteronyssinus*'un en çok karşılaşılan alerjenler olduğu tespit edilmiştir (Açııcı ve ark. 2009). Masuda ve ark. (2000) 42 AD teşhisi konulmuş köpekte yapmış oldukları çalışmada araştırmacılar hem IDT hem de in vitro olarak serum spesifik IgE ile yaygın alerjenleri tespit etmişlerdir. Bu çalışmalarında araştırmacılar en yaygın alerjenin %54,4 (23/54) oranında ev tozu akarlarının olduğunu bulmuşlardır (Masuda ve ark. 2000). Sunulan çalışmamızdaki ev tozu akarlarına yönelik alerji oranlarımız *D. farinae*'nin *D. pteronyssinus* için sırası ile %95,2 ve %76,1 olarak Japonya'da yapılmış olan çalışmaya göre (Masuda ve ark. 2000) oldukça yüksek bulunmuştur. Yine Masuda ve ark. (2000) yapmış oldukları çalışmada IDT ile *D. farinae*'nin *D. pteronyssinus*'a göre daha yüksek oranda pozitiflik verdiğini saptamışlardır. Benzer sonuçlar çalışmamız için de geçerli olmuştur. Zira sunulan çalışmada *D. farinae*'nin 21 AD'li köpeğin 20'sinde pozitiflik verdiği (%95,2) görülmüştür. Öte yandan yine çalışmamızda *D. pteronyssinus*'a karşı pozitiflik oranı %76,1 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar Birleşik Krallık'ta yapılan ev tozu akarlarına yönelik alerjisi olan köpeklerde en fazla görülen alerjenin *D. farinae* olduğu sonucu (Sture ve ark. 1995) ve yine Japonya'daki AD'li köpeklerdeki yaygın alerjenlerin tespitini amaçlayan ve en çok pozitiflik veren alerjenin *D. farinae* olduğu sonucu ile de örtüşmektedir (Masuda ve ark. 2000).

Benzer şekilde Amerika Birleşik Devletleri, Kuzey Kaliforniya'da 266 AD'li köpeğin alerjen profillerinin belirlenmesine yönelik çalışmada Zur ve ark. (2002) ev tozu akarlarının %71 oranında en fazla görülen alerjen olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacıların bu

sonuçları çalışmamız sonuçları ile de örtüşmektedir. Diğer taraftan Kim ve ark. (2011) Kore'de 58 AD teşhisi konulmuş Maltase ırkı köpeklerde IDT ile alerjen tayinlerinde ev tozu akarlarına yönelik sadece %49,1 oranında pozitiflik bulmuşlardır. Bu oran, bu çalışmada elde edilen bulgulara göre değerlendirildiğinde daha düşük bulunmuştur. Kang ve ark. (2014)'nın Kore'de 101 AD köpeğin 92 alerjene yönelik in vitro serum spesifik IgE tayini ile yapılan çalışmalarında ise ev tozu akarlarının pozitiflik oranının çalışmadaki en yüksek pozitiflik oranına (%61,4) sahip olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacıların ev tozu akarlarına yönelik AD'li köpeklerde farklı sonuçlar elde etmeleri ise test yöntemlerinin farklı olması ile açıklana bilinir. Ülkemizdeki AD'li köpeklerde alerjen tayini belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Temizel ve Aytug (2011) yılında 50 adet AD'li köpekte 16 farklı alerjenin tayinini IDT ile gerçekleştirmişler ve ev tozu akarlarının %66 oranında pozitiflik verdiği, bunlardan da en çok pozitiflik veren alerjenin *D. farinae* olduğu sonucunu rapor etmişlerdir. Araştırmacıların çalışması ile sunulan sonuçlarımız örtüşmektedir.

Köpek alerji testleri ile mevcut literatürde yaygın olmayan ancak çalışmamız kit içeriğinde bulunan ve sonuçları itibarı ile en yaygın 3. sırada %71 oranı ile depo akarlarından *A. siro* ile 4. sırada %61 oranı ile diğer bir depo akarı olan *T. putrescantiae* %47 oranında en sık 5. olarak görülen ise *Lepidoglyphus* yer almaktadır. Veteriner pratikte KAD'li hastaların alerjen profil değerlendirilmesi yapılan çalışmalarda bahsi geçen depo akarları çoğu çalışmada toplu olarak değerlendirilmiş ve ayrı türlerde spesifik olarak çalışılmak yerine topluca çalışılmış olması sonuçlarımızın kıyaslanmasına olanak tanımamıştır. Bununla beraber, *A. siro* ve *T. putrescantiae*'nin karışım halinde tek alerjen olarak ELISA ile değerlendirilen çalışmalarda araştırmacılar Hammerling ve De Weck (1998) (Immunodot); Hammerling ve De Weck (1998) (ELISA); Zunic (1998) (Immunodot) sırası ile AD'li köpeklerde bu alerjenlerin %80, %37 ve %38 oranında pozitiflik verdiğini bildirmişlerdir.

Zur ve ark. (2002)'nin yapmış oldukları çalışmada 266 AD'li köpekten 76'sının hem ev tozu akarlarına hem de pireye karşı reaksiyon verdiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise depo akarlarından *A. siro* ve *T. putrescantiae*'ya karşı pozitiflik veren köpeklerin aynı zamanda *D. farinae* ile *D. pteronyssinus*'a pozitiflik verme oranları oldukça yüksek bulunmuştur. Örneğin bir bitki akarı olan *A. siro*'ya karşı pozitif olan köpeklerin %92'sinin *D. farinae*'ya, diğer taraftan aynı köpeklerin *D. pteronyssinus*'a %100 pozitiflik verdiği dikkat çekmektedir.

Aynı zamanda çalışmamızda bir un akarı olan *T. putrescantiae*'ya pozitiflik veren 13 köpeğin %100'ünün *D. farinae*'aya, %92 oranında da *D. pteronyssinus*'a

pozitiflik verdiğini görmekteyiz. Bununla beraber *Lepidoglyphus*'a pozitiflik veren 10 köpeğin tamamının *D. farinae*'aya ve *D. pteronyssinus*'a %90 oranında pozitiflik verdiğini görmekteyiz. Bu sonuçlar gıda akarlarına pozitiflik veren tüm köpeklerin ev tozu akarlarına da yüksek oranda pozitiflik verdiğini göstermektedir.

Özellikle depo akarlarının köpek kuru mama yapımı esnasında gıdaya geçerek köpeklere alerjik reaksiyon veren protein kaynaklarını oluşturabileceğini düşünmekteyiz. Öyle ki çalışmamızı oluşturan 21 köpekten 20'sinin kuru mama tüketim öyküsü bulunmaktadır. Aynı zamanda çalışma sonunda hasta sahiplerine uyguladığımız anket sonucunda büyük çoğunluğunun aynı kuru mama markasını kullandıkları tespit edilmiştir. Bu sonuç bahsi geçen akarların kuru mamalardaki mevcut yüklerinin incelenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Alerjen profili değerlendirmesinde küf grubunda bulunan *Malassezia*, *Aspergillus/Penicillium* ve *Alternaria/Cladosporium* lar diğer çalışmalarda oldukça yüksek oranda pozitiflik vermişlerdir. Örneğin Zur ve ark. (2002) değişik küf türlerinin 160 köpekte %60 oranında pozitiflik verdiğini bu grup alerjenin ise totalde ev tozu akarlarından sonra en çok pozitiflik veren ikinci alerjen grubu olduğunu belirtmişlerdir. Diğer taraftan Kim ve ark. (2011) küf alerjenlerini %67,3 oranında en yüksek pozitiflik veren grup olduğunu belirtmişlerdir. Masuda ve ark. (2000) ise küf mantarlarının çalışmalarında %16,7'lik bir oranla AD'li köpeklerdeki en düşük pozitiflik veren grup olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamız küf grubunu oluşturan alerjenlerden *Malassezia* %9,5 görülme oranı ile 10. sırada yer alırken, %4,8 oranı ile 11. sırada *Aspergillus/Penicillium* sadece bir köpekte görülmüştür. Altı numaralı alerjen olan klado küfü *Alternaria/Cladosporium* ise hiçbir köpekte pozitiflik vermemiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar Masuda ve ark. (2000) ve Temizel ve Aytug (2011) ile örtüşmektedir. Öte yandan Kang ve ark. (2014) yapmış oldukları çalışmada ise küf mantarları grubunun KAD'li köpeklerde %39,6 oranında, *Malassezia*'yı ise %21,9 oranında pozitif olarak bulmuşlardır. Araştırmacıların bu sonuçları da mevcut çalışmamızdan oldukça yüksektir. Küf mantarlarının AD'li köpeklerde pozitiflik oranlarının araştırıldığı çalışmalardaki oranların farklılıkları köpeklerin yaşam alanlarının coğrafi, iklim ve nem oranları ile testlerin yapıldığı metotlarının farklılıklarından da şekillenebilmektedir. Zira serum spesifik IgE'nin IDT'ye oranla küf mantarlarının tespitinde yetersiz kaldığı ve bu teknik ile ölçülen sonuçların güvenilirliğinin sorgulanabileceği belirtilmektedir. Küf mantarlarına karşı klinik belirtilerin şekillenme oranı ve bu grup alerjenlere pozitiflik verme oranlarının yüksek rutubet ve nem oranının olduğu kış aylarında daha yüksek olduğu bildirilmekle beraber çalışmamız köpeklerinin çoğunluğun numune toplama

zamanlarının kış ayı içerisinde olduğu ancak toplamda yine çalışma köpeklerimizin bu grup alerjene pozitiflik verme oranlarının oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum iklim açısından oldukça nemli olan Samsun ilinde yaşayan köpekler için beklenmeyen bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak, gerek serolojik gerekse IDT olarak gerçekleştirilen ve AD'li köpeklerde küf mantarlarının değerlendirildiği çalışmalarda çoğunlukla bu grubun içinde yer alan ekme küfü olan *Rhizopus*'usun ayrı ya da karışım olarak çalışıldığını belirtmek gerekir. Beraberinde *Rhizopus*'usun bu çalışmalarda oldukça yüksek oranda pozitiflik verdiği de bildirilmektedir (Masuda ve ark. 2000, Zur ve ark. 2002, Kim ve ark. 2011, Kang ve ark. 2014).

Çevresel alerjenlerin başında hava kaynaklı alerjenler gelmektedir. Özellikle dış çevre ortamında yer alan çevresel alerjenler ana başlıklar halinde çim, ağaç ve ot polenleri olarak sınıflandırılabilirler. *Cocksfoot*, *Meadow Fescue*, *Rye çim*, *Timothy çim*, *Kentucky Blue çim*, *Velvet çim* poleni olmak üzere 6 farklı çim polenini içermektedir. Ağaç polenlerini *Plantane/ Willow/Poplar* ve *Birch/ Alder/Hazel* oluşturmaktadır. Ot polenleri ise çalışmamız kit paneli içeriğinde yer alan *Parietaria (Wall pellitory)*, *Ryepollen*, *Ragweed (Ambrosia)*, *Stinging nettle*, *Lamb'squarter*, *English Plantain*, *Mugwort*, *Sorrel* dir. Avustralya'da 1000'den fazla atopik köpekte herhangi bir polene (çim, ağaç ya da ot) karşı %10 ila %25 oranında hassasiyet IDT ile tespit edilmiştir (Mueller ve ark. 2000). Fransa'nın batısında yapılmış bir çalışmada ise AD'li köpeklerde polen hassasiyetinin cinsiyet, ırk, mevsim ve yaşa bağlı olmadığı tespit edilmiştir (Roussel ve ark. 2013).

Bireylerdeki polen hassasiyetini bölgelerindeki farklılıklar olmak kaydı ile bitki türleri belirlemektedir. Masuda ve ark. (2000) 48 köpekte Japonya'da yapmış oldukları çalışmada bu ülkeye endemik olan Japon çedar polenine (*Cryptomeria japonica*) karşı köpeklerdeki hassasiyetin ev tozu akarlarından sonra %50 oranı ile en yüksek oranda görülen 2. alerjen olduğunu ortaya koymuşlardır.

Önemli bir bulgu da köpeklerdeki çim polenine karşı hassasiyetin tıpkı insanlardaki gibi artış göstermiş olmasıdır. Öyle ki 1990 ila 2000 yıllarında %14,4 olan bu oran 2007 ila 2010 yılları arasında %27,7'ye yükselmiştir.

Çalışmamızda 20 alerjen içinde %47 oranında en sık olarak görülen, 5. Alerjen *Grass-Mix*'tir. Sonuçlarımız (%47) sırası ile AD'li köpeklerde %15 (Sture ve ark. 1995), %31,4 (Masuda ve ark. 2000), %35,3 (Zur ve ark. 2002) sonuçlarından yüksek bulunmuş olup, Kim ve ark. (2011) yılında yapmış oldukları çalışmada AD'li köpeklerde çimlere karşı hiç vakanın pozitiflik vermediğini bildirmişlerdir. Öte yandan, sonuçlarımızın Nesbitt (1978) yılında yaptığı çalışmadan (%76) düşük olduğu tespit edilmiştir. Zur

ve ark.(2002) AD'li 266 köpekten 94'ünün en az 1 ila 9 farklı çim polenine karşı hassasiyet gösterdiğini, dişilerin erkeklere kıyasla istatistiksel oranda daha fazla hassasiyet gösterdiklerini, benzer şekilde mevsimsel farklılıklarda sonbahar ve yaz aylarında köpekler arasındaki hassasiyetin arttığını tespit etmişlerdir. Bu araştırmada diğer araştırmalardan farklı olarak numuneler kış aylarında toplanmıştır. Buna rağmen diğer çalışmalara oranla çim polenine karşı pozitiflik oranı oldukça yüksek (%47) bulunmuştur. Bu oranın yüksek olması iklim ve coğrafi konumla ve Samsun ilinin Orta Karadeniz Bölgesi'nde ve sürekli yağış alan ve doğal plantasyonun yüksek olduğu bir şehir olması ile açıklanabilir.

Zur ve ark. (2002) çime karşı pozitiflik bulunan köpekler arasında yaş veya cinsiyet farklılığının önemsiz olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu noktada çalışmamızdaki köpeklerinde de çim karışımlarına karşı hassasiyetlerinde cinsiyet, ırk, beslenme, yaşa bağlı herhangi bir istatistiksel farklılık görülmemiştir. Kültürü yapılan bitkiler içinde yer alan çavdar otu (*Ryepollen*), gibi diğer otları oluşturan çalışmamız test panelinde *Parietaria (Wall pellitory)*, *Ragweed (Ambrosia)*, *Stinging nettle*, *Lamb'squarter*, *English Plantain*, *Mugwort*, *Sorrel* yer almaktadır. Yüzde 47 oranında en sık 5. olarak görülen, *Lepidoglyphus*, *Ryepollen*, *Grass-Mix* alerjenleri yer almıştır. Altıncı sırada %38 oranında muz familyası bitki polenlerinden *English Plantain* ve kuzukulağı poleni olan *Sorrel* ve bunun yanında ısırgan otu poleni olan *Stinging nettle* ile albüm otu poleni olan *Lamb's quarter* %19 görülme oranı ile 8. sırada yer aldığı tespit edilmiştir. Dokuzuncu sırada yer alan pelin otu poleni olan *Mugwort* %14 oranında AD'li köpeklerde görülmüştür. Saman nezlesi poleni *Ragweed (Ambrosia)* %9,5 görülme oranı ile 10. sırada yer almıştır. Son olarak 11. sırada sadece birer köpekte görülen %4,8 oranı ile yapışkan otu poleni olan *Parietaria (Wall pellitory)* yer almaktadır.

Ot polenlerinin ayrı ayrı hassasiyetlerinin araştırıldığı çalışmalar sayıca az olsa da birlikte değerlendirildikleri çalışmalarda köpeklerde %17,1 (Masuda ve ark. 2000), %25,5 (Kim ve ark. 2011), %45,5 (Zur ve ark. 2002) oranlarında seropozitiflik tespit edilmiştir. Kang ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada ot polenlerinin hassasiyetlerinin diğer alerjenlere oranla önemsiz olduğunu belirtmiş olsalar da araştırmacılar *English Plantain*'i %52 oranında mevcut çalışmamızdan (%38) daha yüksek bulmuşlardır. Bununla beraber, AD'li köpeklerde *Ragweed (Ambrosia)* %59 (Nesbitt ve ark. 1984) bir başka çalışmada da %13,6 (Roussel ve ark. 2013) olarak bulunmuştur. Bu araştırmalardan elde edilen sonuçların, çalışmamızda elde edilen bulgulardan daha yüksek olduğu (%9,5) görülmektedir. Pelin otu poleni olarak bilinen *Mugwort* ise mevcut çalışmamızda AD'li köpeklerde %14 olarak görülmüştür. Bu oran sırası ile %9,6 (Chanthick ve ark. 2008), %10 (Sture ve ark. 1995) ve %11,9 (Roussel ve ark. 2013) bulunan çalışmalardan

## SONUÇ

yüksek olmakla beraber %52 oranında bulan Nesbitt ve ark. (1984)'dan düşüktür. Öte yandan Zur ve ark. (2002) yapmış oldukları çalışma sonuçlarına göre ot polenlerinin AD'li köpeklerdeki en önemsiz alerjen grubunu oluşturduğunu ve çalışmalarındaki 266 köpekten 79'unun hassasiyet gösterdiğini ve bu köpeklerde cinsiyet ve yaşın önemsiz olduğunu ancak ırk bazında Labrador Retriever'ların bu alerjenlere hassasiyet gösterme oranlarının istatistiksel olarak yüksek bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Aksine aynı araştırmacılar Daschund ırkı köpeklerde bahsi geçen alerjen grubuna hassasiyet oranlarının istatistiksel olarak oldukça düşük olduğunu tespit etmişlerdir (Zur ve ark. 2002). Bizim çalışmamızda ise ot polenlerinden çavdar otunun (*Rye pollen*) dışında kalan ot polenlerin hassasiyet oranı diğer alerjenlere oranla daha önemsiz olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda AD'li köpeklerde hassasiyet bakımından altıncı sırada %38 oranında insekt grubundan tek alerjen olan *Ctenocephalides* spp. yer almaktadır. Pire kaynaklı alerjiler, veteriner dermatoloji pire enfestasyon olgularının çok yaygın olarak rastlanılması nedeniyle serolojik ve IDT testlerine gereksinim duyulmadan klinik olarak teşhis edilebilirler.

İki yüz altmışaltı köpeğin dâhil edildiği ve alerjenlerin tespit edildiği KAD'li köpeklerden 102 tanesinin pire alerjenlerine pozitif reaksiyon verdiği, bu pozitifliğin de gerek yaş, ırk ve cinsiyetle ilgili bir farklılık oluşturmadığı tespit edilmiştir (Zur ve ark. 2002). Ancak bahsi geçen araştırmacılar pire alerjisine pozitiflik veren 75 köpeğin aynı zamanda da ev tozu akarlarına da pozitiflik verdiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda pire alerjenine pozitiflik oranı (%38) ise Zur ve ark. (2002) ile aynı oranda bulunurken ülkemizde gerçekleştirilen AD'li köpeklerde yapılan bir çalışmada (Temizel ve Aytug 2011) pire alerjenine pozitiflik oranına (%48) göre düşük bulunmuştur. Bununla birlikte çalışmamız sonuçlarının aynı araştırmacıların sonuçlarında olduğu gibi pire alerjenine pozitiflik veren köpeklerin tamamının birinci tip ev tozu akarı ile de pozitiflik verdiği tespit edilmiştir. Kim ve ark. (2011)'nın pire alerjeni yönünden AD'li köpeklerde buldukları %25,5 pozitiflik oranı çalışmamızdan düşük olmakla beraber Kang ve ark. (2014) yaptıkları çalışmalarında AD'li köpeklerin pire alerjeni bakımından daha da düşük (%7,9) pozitiflik verdiğini ortaya koymuşlardır. Pire alerjileri ile ilgili çalışmaların tümünde AD'li köpeklerden yaş, ırk, cinsiyet veya mevsimsel faktörlerin etkili olmadığı sonucuna varılmış olsa da çalışmamızda AD'li dişi köpeklerin pire alerjenine pozitiflik verme oranı (%87,5) ile erkek köpeklerin pire alerjenine pozitiflik verme oranı (%38,1) arasında istatistiksel farklılık ( $p<0.05$ ) bulunmuştur.

Mevcut çalışma ile ilk kez Samsun ili ve çevresinden Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine getirilen değişik ırk, cinsiyet ve yaşlardaki 21 adet AD'li köpekte 20 farklı alerjene özgü serum spesifik IgE düzeylerine bakılmıştır. Bu araştırma ile ev tozu akarlarının sadece insan sağlığı açısından değil, evlerde bakıp beslenen köpeklerin sağlığı açısından da önemli olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle Samsun yöresinde, evlerinde köpek besleyen kişilerin ev tozu akarları açısından temizlik ve hijyen kurallarına dikkat etmeleri gerekmektedir. Araştırmamızda hasta sahiplerinden beslenme şekillerinde kuru mama bulunan köpeklerin çoğunda aynı marka köpek kuru maması kullanıldığı bilgisine ulaşılmıştır. Bu nedenle köpek kuru maması imalatı sırasında kullanılan ham maddelerin depo akarları yönünden mutlaka incelenmesi ve mümkün olduğunca depo akarı yönünden arı hammaddelerin kullanılması gerekmektedir.

Bununla birlikte Samsun yöresinde AD'li köpeklerde antijenlere spesifik serum IgE oranlarının yüksek oranda seropozitiflik vermesinden dolayı evlerde bakılan kedilerinde serum spesifik IgE antijen profillerinin incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

*Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince PYO.VET.1904.17.016 proje numarası ile desteklenmiş ve Öykü Barlı'nın aynı isimli Yüksek Lisans Tezi'nden özetlenmiştir. Ayrıca çalışmanın istatistikğini yapan Sayın Prof.Dr. Filiz Akdağ'a şükranlarımızı sunarız.*

*Çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunca (Etik Kurul No:2016/63) onaylanmıştır.*

## KAYNAKLAR

- Açırcı M, İğde M, Beyhan YE, Pekmezci GZ, Gürler AT, Hokelek M, Umur Ş.** Ev ve işyerlerinde ev tozu ve akar faunası. Ondokuz Mayıs Üniv Tıp Fak Derg. 2009; 25(1): 7.
- Carlotti DN, Costargent F.** Analysis of positive skin tests in 449 dogs with allergic dermatitis. Prakt Med Chir An de Cie. 1992; 27: 53-69.
- Chanthick C, Anaman S, Buathet K.** The prevalence of positive intradermal allergy tests in 114 dogs with atopic dermatitis in the Bangkok metropolis, Thailand. Vet Immunol Immunopathol. 2008; 126: 256-262.
- Codner EC, Tinker MK.** Reactivity to intradermal injections of extracts of house dust and house dustmite in healthy dogs and dogs suspected of being atopic. J Am Vet Med Assoc. 1995; 206: 812-816.
- De Weck AL.** What can we learn from the allergic zoo? Int Arch Allergy Immunol. 1995; 107: 13-18.

- Favrot C, Steffan J, Seewald W, Picco F.** A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol.* 2010; 21(1): 23-31.
- Griffin CE, DeBoer DJ.** The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001; 81(3-4): 255-269.
- Halliwell RE, Schwartzman RM, Rockey JH.** Antigenic relationship between human IgE and canine IgE. *Clin Exp Immunol.* 1972; 10(3): 399-407.
- Hammerling R, De Weck AL.** Comparison of two diagnostic tests for canine atopy using monoclonal anti-IgE antibodies. *Vet Dermatol.* 1998; 9: 191-199.
- Hill PB, DeBoer DJ.** The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001; 81: 169-186.
- Jeffers JG, Shanley KJ, Meyer EK.** Diagnostic testing of dogs for food hypersensitivity. *J Am Vet Med Assoc.* 1991; 198(2): 245-250.
- Kang MH, Kim HJ, Jang HJ, Park HM.** Sensitization rates of causative allergens for dogs with atopic dermatitis: detection of canine allergen-specific IgE. *J Vet Sci.* 2014; 15: 545-550.
- Kim HJ, Kang MH, Park HM.** Common allergens of atopic dermatitis in dogs: comparative findings based on intradermal tests. *J Vet Sci.* 2011; 12: 287-290.
- Masuda K, Sakaguchi M, Fujiwara S, Kurata K, Yamashita K, Odagiri T, Nakao Y, Matsuki N, Ono K, Watari T, Hasegawa A, Tsujimoto H.** Positive reactions to common allergens in 42 atopic dogs in Japan. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000; 73: 193-204.
- Mueller RS, Bettenay SV, Tideman L.** Aero-allergens in canine atopic dermatitis in southeastern Australia based on 1000 intradermal skin tests. *Aust Vet J.* 2000; 78: 392-399.
- Nesbitt GH.** Canine allergic inhalant dermatitis: a review of 230 cases. *J Am Vet Med Assoc.* 1978; 172: 55-60.
- Nesbitt GH, Kedan GS, Cacciolo P.** Canine atopy. Etiology and diagnosis. *Comp Cont Educ Pract.* 1984; 6: 73-85.
- Nødtvedt A, Bergvall K, Sallander M, Egenvall A, Emanuelson U, Hedhammar A.** A case-control study of risk factors for canine atopic dermatitis among boxer, bullterrier and West Highland white terrier dogs in Sweden. *Vet Dermatol.* 2007; 18: 309-315.
- Prelaud P, Guague ÁE, Alhaidari Z, Faivre N, Heripret D.** Reevaluation of diagnostic criteria of canine atopic dermatitis. *Rev Med Vet.* 1998; 149: 1057-1064.
- Rosser Jr EJ.** Diagnosis of food allergy in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1993; 203(2): 259-262.
- Roussel AJ, Bruet V, Bourdeau PJ.** Characterisation of dog sensitisation to grass pollen in western France from 1999 to 2010. *Vet Rec.* 2013; 172: 686.
- Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Gioulekas D, Leontidis L.** Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; 69: 61-73.
- Scott DW.** Observations on canine atopy. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1981; 17: 91-100.
- Scott DW, Miller WH, Griffin CE.** Muller and Kirk's Small Animal Dermatology 5<sup>th</sup> edn. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995; pp. 500-518.
- Sousa CA, Norton AL.** Advances in methodology for diagnosis of allergic skin disease. *Vet Clin Small Anim Pract.* 1990; 20(6): 1419-1427.
- Sture GH, Halliwell RE, Thoday KL, van den Broek AH, Henfrey JI, Lloyd DH, Mason IS, Ferguson E.** Canine atopic disease: the prevalence of positive intradermal skin tests at two sites in the north and south of Great Britain. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995; 44: 293-308.
- Temizel EM, Aytug N.** Intradermal testing results and clinical features in dogs with atopic dermatitis in Turkey. *J Biol Environ Sci.* 2011; 5: 87-89.
- Willemse T, van den Brom WE.** Investigation of the symptomatology and the significance of immediate skin test reactivity in canine atopic dermatitis. *Res Vet Sci.* 1983; 34: 261-265.
- Willemse T, van den Brom WE, Rijnberk A.** Effect of hyposensitization on atopic dermatitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1984; 184: 1277-1280.
- Zunic M.** Comparison between immunodot tests and the intradermal skin test in atopic dogs. *Vet Dermatol.* 1998; 9: 201-205.
- Zur G, Ihrke PJ, White SD, Kass PH.** Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Vet Dermatol.* 2002; 13(2): 89-102.

## Prevalence of Methicillin Resistance and Panton-Valentine Leukocidin Genes in Staphylococci Isolated from Pırlak Sheep with Subclinical Mastitis in Turkey

Esra ŞEKER<sup>1\*</sup>, Erhan ÖZENÇ<sup>2</sup>, Duygu BAKI ACAR<sup>2</sup>, Müesser YILMAZ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Turkey

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Turkey

<sup>3</sup>Institute of Health Science, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Turkey

### ABSTRACT

This study aimed to investigate the presence of *mecA* and *pvl* genes in 47 Staphylococci previously isolated from 464 half-udder milk samples belong to 235 Pırlak sheep screening for subclinical mastitis. The species from Pırlak sheep used in the present study included: 13 *S. aureus*, 13 *S. epidermidis*, six *S. xylosus*, five *S. chromogenes*, three *S. simulans*, three *S. hyicus*, two *S. warneri*, one *S. lentus* and one *S. saprophyticus*. A total of 10 strains (21.3%) were determined to harbour *mecA* gene, of these, two (4.2%) also contained *pvl* gene. The strains carrying *mecA* gene were found to be *S. aureus* (3/13), *S. xylosus* (3/6), *S. epidermidis* (2/13), *S. lentus* (1/1) and *S. hyicus* (1/3). The presence of *pvl* gene was determined in a total of eight strains (17.0%), six (12.8%) of these were alone. Of *pvl* positive strains, three, three, one, and one were *S. aureus*, *S. xylosus*, *S. simulans* and *S. hyicus*, respectively. To our knowledge, this is the first study showing the presence of *mecA* and *pvl* genes in the Staphylococci isolated from Pırlak sheep with subclinical mastitis in Turkey.

**Keywords:** Mastitis, Methicillin Resistance, Panton-Valentine Leukocidin, Sheep, Staphylococci

\*\*\*

### Türkiye'de Subklinik Mastitisli Pırlak Koyunlardan İzole Edilen Stafilkoklarda Metisilin Direnç ve Panton-Valentine Lökosidin Genlerinin Prevalansı

### ÖZ

Bu çalışmada, subklinik mastitis yönünden taranan 235 Pırlak koyuna ait 464 meme lobu süt örneğinden daha önce izole edilen 47 Stafilkokok türünde *mecA* ve *pvl* genlerinin varlığının araştırılması amaçlandı. Çalışmada, Pırlak koyunlardan izole edilen 13 *S. aureus*, 13 *S. epidermidis*, altı *S. xylosus*, beş *S. chromogenes*, üç *S. simulans*, üç *S. hyicus*, iki *S. warneri*, bir *S. lentus* ve bir *S. saprophyticus* suşu kullanıldı. Toplam 10 suşun (%21,3) *mecA* geni taşıdığı, bunlardan ikisinin (%4,2) ayrıca *pvl* genine de sahip olduğu belirlendi. *mecA* geni taşıyan suşlar *S. aureus* (3/13), *S. xylosus* (3/6), *S. epidermidis* (2/13), *S. lentus* (1/1) ve *S. hyicus* (1/3) olarak bulundu. Toplam sekiz suşta (%17,0) *pvl* geni belirlenirken, bunlardan altısının (%12,8) bu geni tek başına taşıdığı tespit edildi. *pvl* pozitif suşların üçü *S. aureus*, üçü *S. xylosus*, biri *S. simulans* ve biri *S. hyicus* olarak belirlendi. Bilgimize göre, bu çalışma Türkiye'de subklinik mastitisli Pırlak koyunlardan izole edilen Stafilkoklarda *mecA* ve *pvl* genlerinin varlığını gösteren ilk çalışmadır.

**Anahtar Kelimeler:** Koyun, Mastitis, Metisilin Direnci, Panton-Valentine Lökosidin, Stafilkokok

To cite this article: Şeker E, Özenç E, Baki Acar D, Yılmaz M. Prevalence of Methicillin Resistance and Panton-Valentine Leukocidin Genes in Staphylococci Isolated from Pırlak Sheep with Subclinical Mastitis in Turkey. Kocatepe Vet J. (2019), 12(4):424-429.

Submission: 08.09.2019

Accepted: 01.11.2019

Published Online: 19.11.2019

ORCID ID; EŞ: 0000-0003-0969-5286; EÖ: 0000-0002-9179-8796; DBA: 0000-0002-6884-2621; MY:0000-0003-3179-5523

\*Corresponding author e-mail: esraseker@hotmail.com

## INTRODUCTION

The importance of methicillin resistant Staphylococci (MRS), especially methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), has been emphasized in terms of public and animal health because these agents have been accepted to be humanosis and/or zoonosis pathogens (Pantosti 2012). Methicillin resistance has become an increasing urgent problem in veterinary medicine after the first report of MRSA in dairy cows with mastitis (Cuny et al. 2010, Caruso et al. 2016, Aires-de-Sousa 2017). This resistance results from the production of an alternative penicillin-binding protein (PBP2a or PBP2') encoded by the *mecA* gene (Pinho et al. 2001). Although sufficient data on the presence of *mecA* gene in Staphylococci, particularly *S. aureus* strains, isolated from bovine mastitic milk samples have been found (Moon et al. 2007, Türkylmaz et al. 2010, Gezgen and Seker 2016), the investigations related to the prevalence of this gene in Staphylococci isolated from sheep are limited (Vyletřlová et al. 2011, Ünal and Çinar 2012, Ünal et al. 2012).

Panton-Valentine leukocidin (*PVL*) encoded by *lukF-PV* and *lukS-PV* genes is a leukocytolytic toxin causing leukocyte destruction and tissue necrosis (Yoong and Torres 2013). Although epidemiologically the *PVL* toxin has been linked to community-acquired methicillin resistant *S. aureus* infections (CA-MRSA) in the past (Lo and Wang 2011), nowadays, it has been shown that *PVL* may be found in both methicillin susceptible *S. aureus* (MSSA) and MRSA strains (Sharma-Kuinkel et al. 2012). The role of *PVL* in human Staphylococcal infections is not clear and remains an issue of contention (Sharma-Kuinkel et al. 2012). Similarly, its pathogenic role in the pathogenesis of mastitis is still controversial (Ikawaty et al. 2010, Gezgen and Seker 2016).

The Pirlak breed obtained by crossing the Daglic with the Kivircik has a feature between these two breed in terms of basic phenotypic and production performance characteristics. This mid-sized coarse wool sheep also produces meat and milk and is raised in some provinces of the Aegean, Marmara and Mediterranean regions in Turkey (Yilmaz et al. 2013). The researches on the etiology of mastitis in this particular breed are limited (Ozenc et al. 2011) and any data has not been also described on the presence of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin genes in the Staphylococci isolated from Pirlak sheep. Therefore, we aimed to investigate the *mecA* and *pvl* genes in Staphylococci previously isolated from Pirlak sheep with subclinical mastitis in Afyonkarahisar province of Turkey.

## MATERIALS and METHODS

### Bacterial strains

A total of 47 Staphylococci isolates used in this study were previously isolated from 464 half-udder milk samples belong to 235 Pirlak sheep screening for

subclinical mastitis in Afyonkarahisar, Turkey. All isolates were confirmed using Crystal™ Identification Systems Gram-Positive ID kit (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA). The species from Pirlak sheep used in the present study included: 13 *S. aureus*, 13 *Staphylococcus epidermidis*, six *Staphylococcus xylosum*, five *Staphylococcus chromogenes*, three *Staphylococcus simulans*, three *Staphylococcus hyicus*, two *Staphylococcus warneri*, one *Staphylococcus lentus* and one *Staphylococcus saprophyticus*.

### Detection of 16S rDNA, *mecA* and *pvl* genes by PCR

In this study, MRSA ATCC® 33591 and *PVL S. aureus* ATCC® 49775 strains were used as positive control strains and MSSA ATCC® 25923 was used as negative control strain (Oxoid Microbiology Products, Hampshire, UK). DNAs were extracted from control and all test strains using boiling method. The fresh colonies growing on Trypticase Soy Agar (Oxoid Microbiology Products, Hampshire, UK) were suspended in eppendorf tubes containing 500 µL of sterile deionized water and the tubes were held in a 100°C of water bath for 10 min. After this process, the suspension was centrifugated at 9,167 g for 5 min and the supernatant was used for PCR assay (Gezgen and Seker 2016).

Duplex PCR was used for the detection of 16S rDNA and *mecA* genes, while singleplex PCR was performed for *pvl* gene. A total of 25 µL PCR mixture included 2.5 µL 10X PCR buffer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP mix, 20 µM each primers, 1U of Taq DNA polymerase, 5 µL of template DNA and deionized water. The oligonucleotide primers and PCR amplification conditions of 16S rDNA, *mecA* and *pvl* genes were shown in Table 1 and Table 2, respectively. All products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized using ethidium bromide under U.V. light.

## RESULTS

All of 47 *Staphylococcus* strains obtained from half-udder milk samples of Pirlak sheep showed 16S rDNA specific bands. A total of 10 (21.3%) strains were determined to harbour *mecA* gene, of these, two (4.2%) also contained *pvl* gene. The strains carrying *mecA* gene were found to be *S. aureus* (n=3), *S. xylosum* (n=3), *S. epidermidis* (n=2), *S. lentus* (n=1) and *S. hyicus* (n=1) (Figure 1). The presence of *pvl* gene was determined in a total of eight strains (17.0%). Of *pvl* positive strains, three, three, one, and one were *S. aureus*, *S. xylosum*, *S. simulans* and *S. hyicus*, respectively (Figure 2). The distribution of *mecA* and *pvl* genes was shown in Table 3.



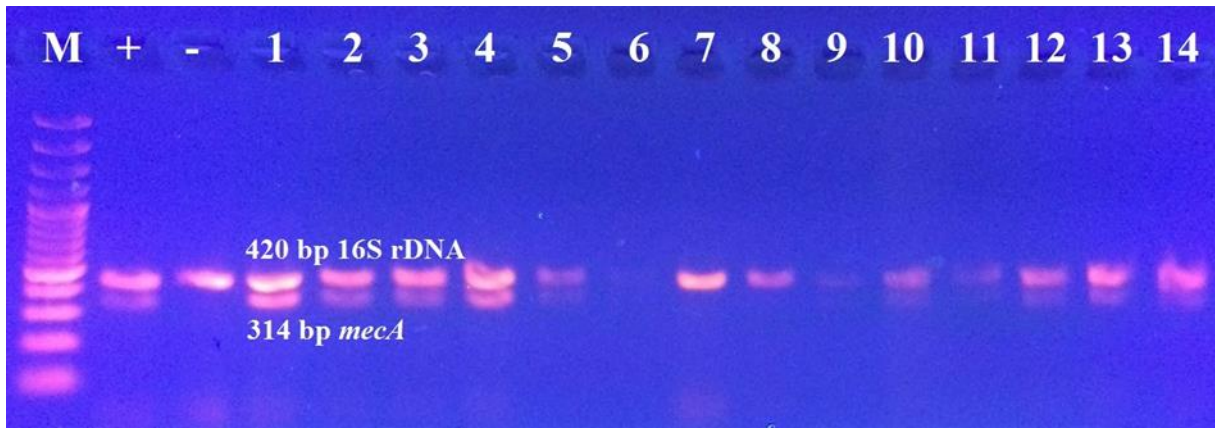
**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerleri  
**Table 1.** Oligonucleotide primers used in this study

Gene	Sequence (5'→3')	Product (bp)	Reference
16S rDNA	CAGCTCGTGTTCGTGAGATGT AATCATTTGTCCCACCTTCG	420	Strommenger et al. 2003
<i>mecA</i>	CCTAGTAAAGCTCC□ GAA CTAGTCCATTTCGGTCCA	314	Choi et al. 2003
<i>pvl</i>	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	433	Lina et al. 1999

**Tablo 2.** 16S rDNA, *mecA* ve *pvl* genleri için PZR amplifikasyon koşulları.

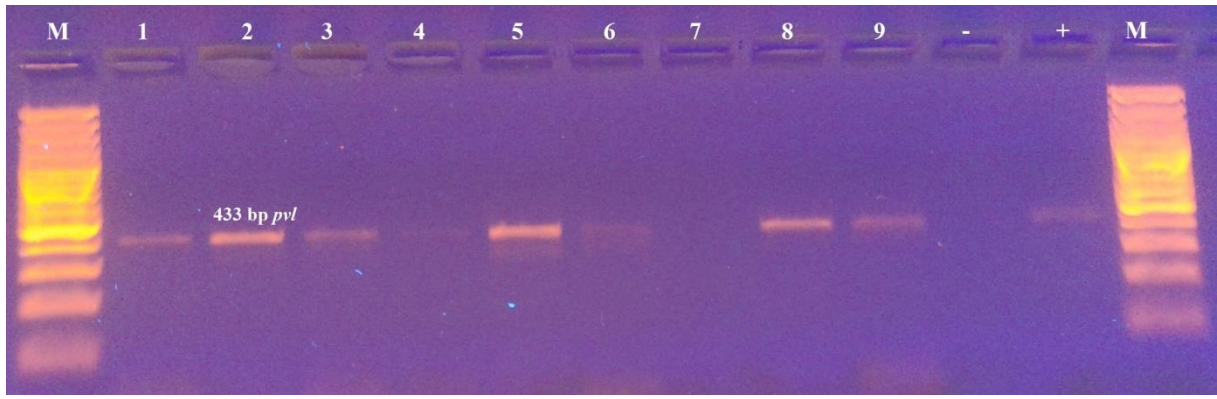
**Table 2.** PCR amplification conditions of 16S rDNA, *mecA* and *pvl* genes (Gezgen and Seker 2016)

Step	Cycle	Temperature		Time	
		<i>mecA</i> and 16S rDNA	<i>pvl</i>	<i>mecA</i> and 16S rDNA	<i>pvl</i>
Initial denaturation	1	95°C	95°C	5 min	5 min
Denaturation	30	95°C	94°C	2 min	30 sec
Annealing	30	54°C	62°C	1 min	30 sec
Extension	30	72°C	72°C	1 min	1 min
Final extension	1	72°C	72°C	7 min	5 min



**Şekil 1.** 16S rDNA ve *mecA* genlerinin dubleks PZR ile belirlenmesi. M: 100 bp DNA ladder; +: pozitif kontrol (MRSA ATCC® 33591); -: negatif kontrol (MSSA ATCC® 25923); sütun 1-3: *mecA* geni pozitif *S. aureus* suşları; sütun 4,5,10: *mecA* geni pozitif *S. xylosus* suşları; sütun 6: 16SrDNA negatif kontrol (steril distile su); sütun 11,12: *mecA* geni pozitif *S. epidermidis* suşları; sütun 13: *mecA* geni pozitif *S. lentus* suşu; sütun 14: *mecA* geni pozitif *S. hyicus* suşu

**Figure 1.** Detection of 16S rDNA and *mecA* genes by duplex PCR. M: 100 bp DNA ladder; +: positive control (MRSA ATCC® 33591); -: negative control (MSSA ATCC® 25923); lane 1-3: *mecA* gene positive *S. aureus* strains; lane 4,5,10: *mecA* gene positive *S. xylosus* strains; lane 6: 16SrDNA negative control (sterile distilled water); lane 11,12: *mecA* gene positive *S. epidermidis* strains; lane 13: *mecA* gene positive *S. lentus* strain; lane 14: *mecA* gene positive *S. hyicus* strain.



**Şekil 2.** PZR ile *pvl* geninin belirlenmesi. M: 100 bp DNA ladder; sütun 1-3: *pvl* geni pozitif *S. aureus* suşları; sütun 4-6: *pvl* geni pozitif *S. xylosus* suşları; sütun 7: *pvl* geni negatif suş; sütun 8: *pvl* geni pozitif *S. simulans* suşu; sütun 9: *pvl* geni pozitif *S. hyicus* suşu; -: negatif kontrol (steril distile su); +: pozitif kontrol (PVL *S. aureus* ATCC® 49775).

**Figure 2.** Detection of *pvl* gene by PCR. M: 100 bp DNA ladder; lane 1-3: *pvl* gene positive *S. aureus* strains; lane 4-6: *pvl* gene positive *S. xylosus* strains; lane 7: *pvl* gene negative strain; lane 8: *pvl* gene positive *S. simulans* strain; lane 9: *pvl* gene positive *S. hyicus* strain; -: negative control (sterile distilled water); +: positive control (PVL *S. aureus* ATCC® 49775).

**Tablo 3.** Subklinik mastitisli Pırlak koyunlardan izole edilen Stafilokoklarda PZR ile belirlenen *mecA* ve *pvl* genlerinin dağılımı.

**Table 3.** Distribution of *mecA* and *pvl* genes detected by PCR in Staphylococci isolated from Pırlak sheep with subclinical mastitis.

Species (no of tested strain)	Genes	No of isolates
<i>S. aureus</i> (n=13)	<i>mecA</i>	2
	<i>pvl</i>	2
	<i>mecA, pvl</i>	1
<i>S. epidermidis</i> (n=13)	<i>mecA</i>	2
<i>S. xylosus</i> (n=6)	<i>mecA</i>	2
	<i>pvl</i>	2
	<i>mecA, pvl</i>	1
<i>S. chromogenes</i> (n=1)	-	-
<i>S. simulans</i> (n=3)	<i>pvl</i>	1
<i>S. hyicus</i> (n=3)	<i>mecA</i>	1
	<i>pvl</i>	1
<i>S. warneri</i> (n=2)	-	-
<i>S. lentus</i> (n=1)	<i>mecA</i>	1
<i>S. saprophyticus</i> (n=1)	-	-

## DISCUSSION

The present study investigated the presence of *mecA* and *pvl* genes in Staphylococci previously isolated from Pırlak sheep with subclinical mastitis.

Staphylococci are the most common etiologic agents isolated from subclinical mastitis cases in sheep (Ozenc et al. 2011, Gelasakis et al. 2015, Queiroga 2017). In recent years, methicillin resistance mediated

by the *mecA* gene has been increasingly reported in Coagulase Negative Staphylococci (CNS) as well as in *S. aureus* isolated from bovine mastitic milk samples (Vyletřlová et al. 2011, Ünal and Çınar 2012, Gelasakis et al. 2015). However, the reports and data related to the prevalence of this gene in Staphylococci isolated from sheep with subclinical mastitis are limited (Vyletřlová et al. 2011, França et al. 2012, Ünal et al. 2012, Martins et al. 2015). Vyletřlová et al.

(2011) reported that the *mecA* gene was obtained in none of *S. aureus* and *S. lentus* strains isolated from sheep with subclinical mastitis. In another study, it was emphasized that none of 37 Staphylococci strains isolated from ovine subclinical mastitic milk samples harboured the *mecA* gene (França et al. 2012). Martins et al. (2015) reported that none of 18 *S. aureus* strains obtained from 473 subclinical mastitic milk samples were carried the *mecA* gene. Similarly, Ünal et al. (2012) from Turkey emphasized that none of 21 *S. aureus* strains isolated from ewes' milk harboured the *mecA* gene. In another study from Turkey, it was reported that *mecA* positivity was found in three (7.5%) of 40 CNS strains isolated from ewes with subclinical mastitis. In the same study, two and one of *mecA* positive strains were identified to be *S. lentus* and *S. xylosum*, respectively (Ünal and Çınar 2012). In our study, *mecA* positivity was found in 10 of 47 (21.3%) Staphylococci strains isolated from Pirlak sheep with subclinical mastitis. The strains carrying *mecA* gene were determined to be *S. aureus* (3/13), *S. xylosum* (3/6), *S. epidermidis* (2/13), *S. lentus* (1/1) and *S. hyicus* (1/3). Compared the other investigations from different countries, the *mecA* positivity obtained from our study may be associated with the intensive and prolonged use of nonspecific antibiotics for the treatment of mastitis in Turkey. However, the geographical variations may be effective on the difference of *mecA* gene prevalence in the strains. These results also showed that CNS, like as *S. aureus*, isolated from Pirlak sheep may be potential reservoirs for *mecA* genes and this may pose a public health risk in terms of dissemination of methicillin resistant strains. It was reported that *mecA* positive CNS strains may transfer the resistance gene to *S. aureus* and other Staphylococci (Huber et al. 2011).

*PVL* is one of the most important and extensively investigated proteins that belong to bicomponent synergohymenotropic toxins family (Yoong and Torres 2013). Although *PVL* is frequently reported as a common virulence factor in MRSA strains, especially CA-MRSA strains, this toxin gene has also been isolated from MSSA in recent years (Strommenger et al. 2003). It has been reported these bicomponent toxins are secreted by some strains of mastitis-causing *S. aureus*, but data on the prevalence of leukotoxins among strains obtained from small ruminants with mastitis is limited. In Brazil, while Aires-de-Sousa et al. (2007) reported that none of the 16 Staphylococci isolates obtained from sheep harboured the *pvl* gene, Martins et al. (2015) emphasized the exotoxin *PVL* was detected in only one (5.5%) strain of 18 *mecA* negative *S. aureus* strains obtained from sheep with subclinical mastitis. In a study from Turkey, it was reported that 14 (66.6%) of the 21 *S. aureus* isolates from mastitic milk samples of small ruminants had *pvl* gene while none of the isolates harboured *mecA* gene (Ünal et al. 2012). In another study, Ünal and Çınar (2012) determined the

*pvl* gene in one *S. simulans* and one *S. warneri* strain among 40 ewe CNS isolates. In the same study, the researchers emphasized none of *mecA* positive strains harboured the *pvl* gene. According to results of our study, a total of eight (17.0%) strains had the *pvl* gene, six of these were alone. The *pvl* gene positive strains were determined to be *S. aureus* (3/13), *S. xylosum* (3/6), *S. simulans* (1/3) and *S. hyicus* (1/3). (Table 3). These findings suggested that *pvl* gene may also be common in CNS isolates and may also be present in *mecA* negative strains. Rainard and Riollet (2006) reported that the neutrophil phagocytosis is a significant defense factor against bacteria causing mastitis on the mammary gland of ruminants. Although the role of *PVL* on mastitis is not clearly understood, the production of this leukotoxin may give more advantages to Staphylococci to resist host defense mechanisms and to settle in the mammary gland.

The present study revealed that CNS, like as *S. aureus*, isolated from Pirlak sheep could be potential reservoirs of *mecA* and *pvl* genes. This may pose a public health risk due to the horizontal transfer of these attributes of pathogenicity to commensals or pathogenic bacteria. In our study, it was also shown that the *pvl* gene could also be found in *mecA* negative strains as well as in *mecA* positive strains. Although the strains carrying both *pvl* and *mecA* genes are considered to be more pathogenic, it should not be ignored the other strains carrying these genes alone, especially CNS strains, may also be potential pathogens for human and animals.

## REFERENCES

- Aires-de-Sousa M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. Clin Microbiol Infect. 2017; 23: 373-380.
- Aires-de-Sousa M, Parente CESR, Vieira-da-Motta O, Bonna ICF, Silva DA, de Lencastre H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. Appl Environ Microbiol. 2007; 73: 3845-3849.
- Caruso M, Latorre L, Santagada G, Fraccalvieri R, Miccolupo A, Sottili R, Palazzo L, Parisi A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in sheep and goat bulk tank milk from Southern Italy. Small Rumin Res. 2016; 135: 26-31.
- Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kang JH, Shin WS, Kang MW. Multiplex PCR for detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. J Korean Med Sci. 2003; 18: 631-636.
- Cuny C, Friedrich A, Kozytzka S, Leyer F, Nübel U, Ohlsen K, Strommenger B, Walther B, Wieler L, Witte W. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. Int J Med Microbiol. 2010; 300: 109-117.
- França CA, Peixoto RM, Cavalcante MB, Melo NF, Oliveira CJB, Veschi JA, Mota RA, Costa MM. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. Pesqui Vet Bras. 2012; 32: 747-753.

- Gelasakis AI, Mavrogianni VS, Petridis IG, Vasileiou NGC, Fthenakis GC.** Mastitis in sheep – The last 10 years and the future of research. *Vet Microbiol.* 2015; 181: 136-146.
- Gezgen C, Seker E.** Investigation of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococci* isolated from bovine mastitis. *Acta Sci Vet.* 2016; 44: 1373.
- Huber H, Ziegler D, Pflüger V, Vogel G, Zweifel C, Stephan R.** Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. *BMC Vet Res.* 2011; 7: 1-7.
- Ikawaty R, Brouwer EC, van Duijkeren E, Mevius D, Verhoef J, Fluit AC.** Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in the Netherlands. *Int J Dairy Sci.* 2010; 5: 60-70.
- Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J.** Involvement of Panton–Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1999; 295: 1128-1132.
- Lo W, Wang C.** Panton-Valentine leukocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatr Neonatol.* 2011; 52: 59-65.
- Martins KB, Faccioli-Martins PY, Riboli DFM, Pereira VC, Fernandes S, Oliveira AA, Dantas A, Zafalon LF, Cunha MLR.** Clonal profile, virulence and resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep milk. *Braz J Microbiol.* 2015; 46: 535-543.
- Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, Park YH, Joo YS, Koo HC.** Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Korea. *J Dairy Sci.* 2007; 90: 1176-1185.
- Ozenc E, Seker E, Baki Acar D, Birdane MK, Darbaz I, Dogan N.** The importance of *Staphylococci* and threshold value of somatic cell count for diagnosis of sub-clinical mastitis in Pirlak sheep at mid lactation. *Reprod Domest Anim.* 2011; 46: 970-974.
- Pantosti A.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. *Front Microbiol.* 2012; 3: 1-12.
- Pinho MG, Filipe SR, de Lencastre H, Tomasz A.** Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2001; 183: 6525-6531.
- Queiroga MC.** Prevalence and aetiology of sheep mastitis in Alentejo region of Portugal. *Small Rumin Res.* 2017; 153: 123-130.
- Rainard P, Riollot C.** Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res.* 2006; 37: 369-400.
- Sharma-Kuinkel BK, Ahn SH, Rude TH, Zhang Y, Tong SYC, Ruffin F, Genter FC, Braughton KR, DeLeo FR, Barriere SL, Fowler VG.** Presence of genes encoding panton valentine leukocidin is not the primary determinant of outcome in patients with hospital-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 848-856.
- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W.** Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *S. aureus*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4089-4094.
- Türkyılmaz S, Tekbıyık S, Oryasin E, Bozdoğan B.** Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses Public Health.* 2010; 57: 197-203.
- Ünal N, Çınar OD.** Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton–Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Trop Anim Health Prod.* 2012; 44: 369-375.
- Ünal N, Askar Ş, Macun HC, Sakarya F, Altun B, Yıldırım M.** Panton–Valentine leukocidin and some exotoxins of *Staphylococcus aureus* and antimicrobial susceptibility profiles of staphylococci isolated from milks of small ruminants. *Trop Anim Health Prod.* 2012; 44: 573-579.
- Vyletělová M, Hanuš O, Karpíšková R, Štásková Z.** Occurrence and antimicrobial sensitivity in *Staphylococci* isolated from goat, sheep and cow's milk. *Acta Univ Agric Silvic Mendel Brun.* 2011; 59: 209-214.
- Yilmaz O, Cengiz F, Ertugrul M, Wilson RT.** The domestic livestock resources of Turkey: sheep breeds and cross-breeds and their conservation status. *Anim Genet Resour.* 2013; 52: 147-163.
- Yoong P, Torres VJ.** The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. *Curr Opin Microbiol.* 2013; 16: 63-69.

## Determination of Persistent Organic Pollutants in Water and Sediment Samples from Kızılırmak River

Özgür KUZUKIRAN<sup>1\*</sup>, Ayhan FİLAZİ<sup>2</sup>, Pınar ARSLAN<sup>3</sup>, Begüm YURDAKÖK DİKMEN<sup>2</sup>, Ülkü Nihan YAZGAN TAVŞANOĞLU<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Cankiri University, Eldivan Vocational School of Health Services, Department of Veterinary Medicine, 18700, Cankiri, Turkey

<sup>2</sup>Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, 06110, Ankara, Turkey

<sup>3</sup>Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, 06100, Ankara, Turkey

<sup>4</sup>Cankiri University, Eldivan Vocational School of Health Services, Department of Medical Services and Techniques, 18700, Cankiri, Turkey

### ABSTRACT

The organic chlorinated pesticide (OCP), polybrominated diphenylether (PBDE) and polychlorinated biphenyls (PCBs), which can be found in nature due to their persistence even decades after their prohibition, are deposited in sediment and released back to water depending on environmental and climatic conditions. Kızılırmak, the longest river of Turkey, passes through ten provinces and flows from the Central Anatolia to the Black Sea. There is an organized industrial zone, petrochemical and weapon facilities on Kızılırmak River within Kırıkkale border and the city's sewage is discharged into the river. Therefore, the amount of persistent organic pollutants (POPs) present in water and deposited in sediment is important for the areas where river water is used. In this study, it was aimed to determine the seasonal changes, if any, by evaluating the total amount of 22 POPs; 9 OCPs ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane, hexachlorobenzene, heptachlor, 4,4'-dichlorodiphenyldichloroethane-4,4'-DDE, 4,4'-dichlorodiphenyldichloroethylene-4,4'-DDD, 2,4'-dichlorodiphenyl trichloroethane-2,4'-DDT, 4,4'-dichlorodiphenyl trichloroethane-4,4'-DDT), 7 PCBs (28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) and 6 PBDEs (17, 47, 66, 100, 153, 183) in 60 sediment and 60 water samples collected for 1 year between June 2018 and May 2019. The most frequently detected POP was 4,4'-DDE and the highest residue concentration was in August.

**Keywords:** Persistent organic pollutants, PBDE, PCB, Organochlorine pesticides, Kızılırmak River

\*\*\*

### Kızılırmak Nehri'nden Alınan Su ve Sediment Örneklerinde Kalıcı Organik Kirleticilerin Tespiti

#### ÖZ

Yasaklanmalarının üzerinden onlarca yıl geçmesine rağmen kalıcılıkları nedeniyle hala doğada bulunabilen Kalıcı organik kirleticiler (KOK)'den organik klorlu pestisit (OCP), polibromlu difeniller (PBDE) ve poliklorlu bifenil (PCB)'ler sedimentte birikerek çevre ve iklim koşullarına bağlı olarak suya geri salınmaktadır. Kızılırmak Nehri ise İç Anadolu Bölgesi'nden doğarak Karadeniz'e dökülen on ilin sınırları içinde geçen Türkiye'nin en uzun nehridir. Kızılırmak Nehri'nin Kırıkkale sınırları içindeki bölümü üzerinde organize sanayi bölgesi, petrokimya ve silah tesisleri bulunmakta, şehrin kanalizasyon deşarjı da nehre yapılmaktadır. Bu nedenle suda bulunan ve sedimentte birikmiş olan KOK'ların miktarı nehrin suyunun kullanıldığı bölgeler için önem taşımaktadır. Bu çalışmada Haziran 2018 ile Mayıs 2019 tarihleri arasındaki 1 yıl boyunca toplanan 60 sediment ve 60 su örneğinde 9 OCP ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -heksaklorosikloheksan, heksaklorobenzen, heptaklor, 4,4'-diklorodifenil dikloroetan- 4,4'-DDE, 4,4'-diklorodifenil dikloroeten- 4,4'-DDD, 2,4'-diklorodifenil trikloroetan- 2,4'-DDT, 4,4'-diklorodifenil trikloroetan- 4,4'-DDT), 7 PCB (28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) ve 6 PBDE (17, 47, 66, 100, 153, 183) olmak üzere toplam 22 KOK'un miktarına bakılarak varsa mevsimsel değişikliklerin ortaya konulması amaçlanmıştır. Yapılan analizler sonucunda en sık tespit edilen KOK'un 4,4'-DDE, kalıntı konsantrasyonunun en yüksek olduğu ayın ise Ağustos olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kalıcı organik kirleticiler, PBDE, PCB, Organik klorlu pestisitler, Kızılırmak Nehri.

To cite this article: Kuzukiran Ö., Filazı A., Arslan P., Yurdakök Dikmen B., Yazgan Tavşanoğlu Ü.N. Determination of Persistent Organic Pollutants in Water and Sediment Samples from Kızılırmak River. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4):430-436.

Submission: 27.09.2019 Accepted: 11.11.2019 Published Online: 24.11.2019

ORCID ID; ÖK: 0000-0001-9294-2801, AF: 0000-0002-2800-6215, PA: 0000-0002-2800-6215,

BYD: 0000-0002-0385-3602, ÜNYT: 0000-0001-8462-415x

\*Corresponding author e-mail: ozgurkuzukiran@karatekin.edu.tr

Günümüzde dünyanın ekosistemi farklı kirleticiler tarafından sürekli olarak kirletilmektedir. Bölgelere göre değişen çok çeşitli kirleticiler bulunmaktadır. Bunlar içinde bazılarının çevresel degradasyona (kimyasal, biyolojik ve fotolitik reaksiyonlar) karşı daha dayanıklı oldukları bildirilmiştir. Çevremizde uzun süredir varlığı sürdüren bu kirletici maddeler kalıcı organik kirleticiler (KOK) olarak isimlendirilmektedirler. Kullanımları uzun zaman önce yasaklanmış olmasına rağmen hala yaygın olarak bulunan KOK'ların organik klorlu pestisit (OCP), poliklorlu bifenil (PCB) polibromlu difenileter (PBDE)'ler olduğu belirtilmiştir (WHO 2019, Ren ve ark. 2018). Genellikle hidrofobik yapıda olan bu kimyasalların suya karıştıktan sonra sudaki partiküllere süratle bağlanıp sedimentte biriktikleri bildirilmiştir. Lipofilik özelliklerinden dolayı eliminasyonları çok yavaş olduğu için canlı organizmasına girdikten sonra biyoakümülyasyona uğradıkları belirtilmektedir. Bir kere gıda zincirine girdikten sonra bir gıda halkasından diğerine geçerken biyomagnifikasyona uğradıkları ve böylece konsantrasyonlarının sürekli arttığı tespit edilmiştir (Kelly ve ark. 2007). Doğal yaşamdaki canlılarda ve insanlarda bağışıklığın baskılanması, kanser, nöral davranış fonksiyonlarında azalma, endokrin sistem fonksiyonlarında bozulma ve üreme problemleri gibi pek çok soruna neden oldukları gösterilmiştir (Carpenter 2011). Sedimentte biriken KOK'ların degradasyonları ve suya salınımlarının sıcaklık, pH, ultraviyole (UV) ışınları ve ortamdaki iyonlar gibi çevresel koşullara bağlı olarak değiştiği bildirilmektedir. Yarı uçucu olan bu KOK'ların mevsimsel olarak sedimentten suya ve oradan da atmosfere geçişlerinde farklılıklar olabileceği tespit edilmiştir (Sousa ve ark. 2018).

Türkiye'nin en uzun nehri olan Kızılırmak Nehri (1355 km) doğduğu yer (İmranlı-Sivas)'tan Karadeniz'e döküleceği noktaya kadar 10 ilden geçmektedir. Özellikle Kırıkkale ili sınırları içindeki kısmı üzerinde petrokimya ve savunma sanayine ait üretim tesisleri ile organize sanayi bölgesi bulunmaktadır. Çevresinde geniş tarım arazileri bulunan nehre şehrin kanalizasyon sistemi de açılmaktadır. Taşıdığı bu özellikler nedeniyle ekosistem açısından hassas bir konumda olan Kızılırmak Nehri'nin su ve sedimentindeki KOK'ların izlenmesi oluşabilecek sağlık risklerinin yönetilebilmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada nehirde alınan su ve sediment örneklerinde bulunan KOK konsantrasyonlarının tespiti mevsimsel değişikliklerin buna etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

### Örnekler

Çalışma için Kırıkkale ili sınırları içinde Kızılırmak Nehri üzerinde bulunan 5 farklı istasyondan örnek alınmıştır. Bu istasyonların koordinatları 1. istasyon (İ1) 39.7441449-33.4798231, 2. istasyon (İ2) 39.7706830-33.4858105, 3. İstasyon (İ3) 39.8023872, 33.4675272, 4. istasyon (İ4) 39.8405496, 33.4698825 ve 5. istasyon (İ5) 39.927135, 33.426278 şeklindedir (Şekil 1). Her istasyondan Haziran 2018 ile Mayıs 2019 tarihleri arasındaki 12 ay boyunca birer örnek olmak üzere toplamda 60 sediment ve 60 su örneği alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirilmiştir. Sediment örnekleri oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 gün kurutulmuştur. Su örnekleri en fazla 48 saat içinde analize alınmıştır. Su ve sediment örnekleri analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklanmıştır.

### Kimyasallar

Bütün kimyasallar analitik saflıkta seçilmiştir. Diklormetan (DCM), n-hekzan (HEX), (izooktan (İZO), toluen (TOL), asetonitril (ACN) ve magnezyum sülfat (MgSO<sub>4</sub>) Sigma Aldrich (Steinheim, Almanya), primer sekonder amin (PSA) ve C18 ise toz olarak Agilent Technologies (Santa Clara, Amerika Birleşik Devletleri-ABD)'den alındı.

Analitik OCP standartları [alfa-hekzaklorosikloheksan ( $\alpha$ -HCH), beta-hekzaklorosikloheksan ( $\beta$ -HCH), gama-hekzaklorosikloheksan ( $\gamma$ -HCH), hekzaklorobenzen (HCB), heptaklor (HEP), 4,4'-diklorodifenil dikloroetan (4,4'-DDD), 4,4'-diklorodifenil dikloroeten (4,4'-DDE), 2,4'-diklorodifenil trikloroetan (2,4'-DDT) ve 4,4'-diklorodifenil trikloroetan (4,4'-DDT)] ve PCB standartları (PCB28, 30, 52, 101, 118, 138, 153, 180 ve 209) Dr. Ehrenstorfer Laboratories (Augsburg, Almanya), PBDE standartları (17, 47, 66, 100, 153, 183) Wellington Laboratories (Guelph, Kanada), izotop işaretli PCB153 (<sup>13</sup>C<sub>12</sub>) Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, ABD)'den alınmıştır. PCB209 ve izotop işaretli PCB153 (<sup>13</sup>C<sub>12</sub>) internal standart, PCB30 ise enjeksiyon internal standardı olarak kullanılmıştır. Standart stok çözeltileri 100 ng/g derişiminde ACN'de, internal standart çözeltisi 100 ng/g derişiminde TOL içinde, enjeksiyon internal standardı ise 500 ng/g derişiminde İZO'da hazırlanarak -40 °C'de saklandı.

### Ekstraksiyon

Örneklerin ekstraksiyonunda Kuzukıran ve ark. (2016) tarafından kullanılan yöntem modifiye edildi. Yöntem Avrupa Komisyonu Sağlık ve Tüketici Koruma Genel Müdürlüğü'nün (SANCO) 12571/2013 sayılı "Gıda ve Yemlerde Pestisit Kalıntılarının Analizi İçin Analitik Kontrol ve Validasyon Prosedürleri Kılavuzu" ve EUROCHEM'in 2014 yılında güncellediği "Yöntem Validasyonu ve İlişkili Konular Kılavuzu"nda

belirtilen kriterlere göre valide edilerek kullanıldı (Magnusson ve Ornemark 2016).

Su örneklerinin analizi için 0,5 gram C18 ile hazırlanan SPE kartuşlar şartlandırılmak üzere çekerocak altında vakum manifolduna yerleştirildi. Sırasıyla 5 ml HEX, 5 ml ACN, 5 ml DCM ve 5 ml distile su, dakikada 5 ml akış hızı ile geçirildi. Geçirilen 50 ml su örneğinin ardından vakum altında 30 dakika hava geçirilerek kurutulan kartuşlardan 5 ml ACN geçirilerek toplanan özüt 40 °C'de azot altında dikkatlice kurutuldu. Kuru kalıntı 90 µl İZO ile çözülerek vialde toplanıp üzerine 10 µl enjeksiyon internal standardı ilave edildi. Hazırlanan vial GC-MS cihazında okutuldu.

Porselen kapta ezilerek homojenize edilen her bir sediment örneğinden 5 g alınarak 15 ml'lik cam santrifuj tüpüne alındı. Üzerine 10 ml aseton konularak 25°C'de 35 kHz frekans değerindeki ultrasonik banyoda 10 dakika bekletildi. Ardından oda sıcaklığında 10 dk 4000 rpm'de santrifüj edilen cam tüplerdeki sıvının üstteki kısmı alınarak 40°C'de azot altında kurutuldu. Boş bir kartuş içine sırasıyla 0.5 mg C18, 0.5 mg PSA, 0.2 mg MgSO<sub>4</sub> konularak hazırlanan SPE kartuş vakum manifolduna yerleştirildi. İçinden 5x1 ml ACN geçirilerek şartlandırıldı. Cam tüpteki kuru kalıntı 1 ml ACN ile çözdürülerek hazırlanan bu kartuştan geçirildi. Daha sonra 5x1 ml ACN ile toplanan ekstrakt 40°C'de azot altında uçuruldu. Kuru kalıntı 90 µl İZO ile vialde toplanarak üzerine 10 µl enjeksiyon internal standardı ilave edildi. Hazırlanan vial GC-MS cihazında okutuldu.

### Enstrümantal Analiz

Analizlerde, DB-5MS kapillar kolon (30m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film kaplı) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Amerika Birleşik Devletleri) takılmış Thermo Finnigan Trace GC Polaris Q gaz kromatografi kütle spektrometresi (GC-MS) (San Jose, California, ABD) cihazı splitless modda kullanıldı. Kütle dedektörü 250°C, transfer hattı 270°C, enjeksiyon bloğu ise 280 °C sıcaklığa ayarlandı. Mobil faz olarak analitik saflıkta helyum gazı (%99.995) kullanıldı. Akış hızı 1.0 ml/dk olarak ayarlandı.

GC-MS analiz programı olarak Kuzukiran ve ark. (2018) tarafından belirtilen program kullanıldı. GC-MS fırın sıcaklığı başlangıçta 70°C'de 2 dk tutuldu. Daha sonra dk'da 25°C artırılarak 150°C'ye getirildi. Buradan dk'da 5°C artırılarak 200°C'ye getirildi. Burada 5 dk tutulduktan sonra dk'da 5°C artarak 270 °C'ye getirildi. Ardından hiç beklemeden dk'da 25°C artırılarak 290°C'ye getirildi ve 7 dk bekletildi. Toplam program uzunluğu 44 dk olarak hesaplandı. Solvent gecikme zamanı, solvent pikinin atlanması için 11 dk olarak ayarlandı. Kütle taraması için 70 eV enerji uygulanarak 100- 800 m/z arasındaki iyonlar tarandı.

Analitlerin analizi ve doğrulanması bir niceleyici ve 2 niteleyici iyon kullanılarak Seçici İyon Görüntüleme (SIM) moduna göre hesaplandı.

İstatistik hesaplama için kullanılan tek yönlü ANOVA testi "R" paketiyle yapıldı (R Core Team 2014).

### BULGULAR

Su örnekleri için hesaplanan tespit limiti (Limit of detection – LOD) değerleri OCP'lerde 0.18-0.27 ng/g, PCB'lerde 0.19-0.23 ng/g ve PBDE'lerde 0.15-0.28 ng/g, ölçüm limiti (Limit of quantification – LOQ) değerleri ise OCP'lerde 0.55-0.83 ng/g, PCB'lerde 0.58-0.68 ng/g ve PBDE'lerde 0.44-0.85 ng/g olarak bulunmuştur.

Sediment örnekleri için hesaplanan LOD değerleri OCP'lerde 3.41-6.4 ng/g, PCB'lerde 0.77-2.05 ng/g ve PBDE'lerde 1.04-2.10 ng/g, LOQ değerleri ise OCP'lerde 0.55-0.83 ng/g, PCB'lerde 2.29-6.16 ng/g ve PBDE'lerde 3.11-6.65 ng/g olarak bulunmuştur.

Toplanan su örneklerinin %5'inde OCP grubundan 4,4'-DDE tespit edilmiştir. Diğer OCP'lerin kalıntısına rastlanmamıştır. Tespit edilen 4,4'-DDE konsantrasyonları 1.16-9.12 ng/g aralığındadır.

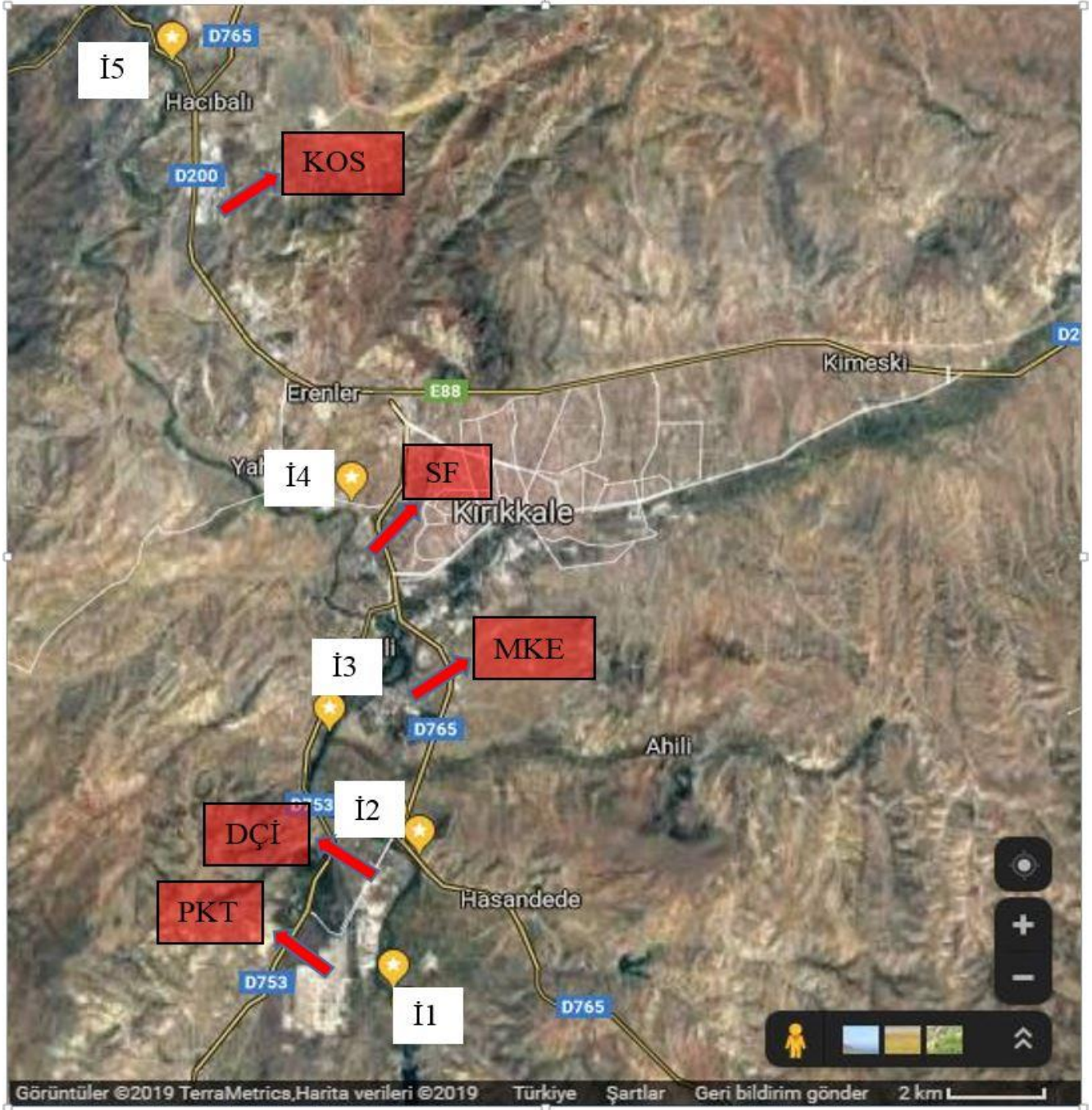
Aynı örneklerde PCB grubundan sadece PCB101, PCB118 ve PCB180 tespit edilmiş olup bu analitlerin görülme sıklıkları sırasıyla %18.33, %10 ve %5, konsantrasyonları ise 0.68-5.02, 1.01-4.92 ve 1.50-4.89 ng/g'dır. Toplam PCB konsantrasyonu 0.68-10.11 ng/g arasındadır (Tablo 1). İki yönlü ANOVA sonuçlarına göre su numunelerinde tespit edilen KOK konsantrasyonları bakımından istatistiksel olarak istasyonlar arasında anlamlı bir farklılık görülmezken mevsimsel farklılıklar anlamlı bulunmuştur (<0.05). Özellikle toplam PCB ve 4,4'-DDE konsantrasyonu yönünden en yüksek değerlerin Ağustos ayına ait olduğu tespit edilmiştir. Toplam PCB yönünden en yüksek konsantrasyonlu örneklerin İ1'den alındığı tespit edilmiştir.

Sediment örneklerinde OCP'lerden sadece 4,4'-DDE, 4,4'-DDD, 2,4'-DDT ve 4,4'-DDT tespit edilmiş olup sırasıyla görülme sıklıkları %95, %12, %3 ve %20, konsantrasyonları ise 5.70-581.74, 9.22-64.17, 56.39-69.09 ve 11.57-85.40 ng/g şeklindedir. Toplam DDT türevi konsantrasyonu 5.70-715.00 ng/g bulunmuştur. Aynı örneklerde tespit edilen PCB grubuna ait analitler PCB101, PCB118, PCB138, PCB153 ve PCB180 olup görülme sıklıkları sırasıyla %62, 3, 23, 12 ve 5, konsantrasyonları ise 5.07-129.67, 4.98-7.52, 3.11-18.59, 6.19-15.56 ve 5.63-7.69 ng/g şeklindedir (Tablo 2a-b). Uygulanan iki yönlü ANOVA sonuçlarına göre sediment numunelerinde tespit edilen KOK konsantrasyonları açısından mevsimsel farklılık gözlenmezken istasyonlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (<0,05). Toplam DDT türevleri yönünden en yüksek



konsantrasyonlu örneklerin İ3'ten, toplam PCB'lerin ise İ4'ten alındığı tespit edilmiştir.

Hiçbir su ve sediment örneğinde tespit edilebilir düzeyde PBDE'ye rastlanmamıştır.



**Şekil 1.** Kızılırmak Nehri üstündeki örnek istasyonları. Nehir akış yönü İ1'den İ5'e doğrudur. İ1-Petro-kimya tesisi (PKT), İ2-Demir-çelik işletmesi (DÇİ), İ3-Makine ve Kimya Endüstrisi Kurumu (MKE), İ4-Silah fabrikası (SF) ve İ5-Kırıkkale organize sanayi (KOS) (GoogleMaps).

**Figure 1.** Sampling location on the Kızılırmak River. The river flow direction is from I1 to İ5. İ1-Petro-chemical plant (PKT), İ2-Iron-steel plant (DÇİ), İ3-Mechanical Chemical Industry Corporation (MKE), İ4-Weapon Plant (SF) and İ5-Kırıkkale organized industry (KOS) (GoogleMaps).



**Tablo 1.** KOK tespit edilen su örneklerinin alındıkları aylar ve tespit edilen miktarları  
**Table 1.** POP detected water samples, collected months and their concentrations

İstasyon	Ay	Konsantrasyonlar (ng/g)				
		PCB101	PCB180	PCB118	Toplam-PCB	4,4'DDE
İ1	1	1.02	*	*	1.02	*
	2	*	*	1.61	1.61	*
	3	*	*	*	*	*
	4	0.74	*	*	0.74	*
	5	*	4.89	*	4.89	*
	8	0.74	4.89	4.48	10.11	9.12
	9	*	*	1.01	1.01	*
İ2	8	2.00	*	*	2.00	*
	9	*	*	*	*	*
İ3	4	*	*	*	*	*
	5	*	*	*	*	*
	8	0.96	*	*	0.96	*
	9	*	*	3.04	3.04	1.18
İ4	1	0.80	*	*	0.80	*
	4	0.74	4.52	*	5.26	*
	5	0.76	*	*	0.76	*
	8	5.02	*	4.52	9.54	*
	9	*	*	4.92	4.92	1.16
İ5	1	0.73	*	*	0.73	*
	4	0.82	1.50	*	2.32	*
	5	0.68	*	*	0.68	*
	9	*	*	2.99	2.99	2.44
	12	*	*	*	*	*

**Tablo 2a.** KOK tespit edilen sediment örneklerinin alındıkları aylar ve tespit edilen miktarları  
**Table 2a.** POP detected sediment samples, collected months and their concentrations

İstasyon	Ay	Konsantrasyonlar (ng/g)										
		PCB 101	PCB 153	PCB 138	PCB 180	PCB 118	Toplam PCB	4,4'-DDE	4,4'-DDD	2,4'-DDT	4,4'-DDT	Toplam DDT
İ1	1	5.76	*	*	*	*	5.76	22.23	*	*	*	22.23
	2	*	*	*	*	16.61	16.61	17.46	*	*	*	17.46
	3	6.10	*	*	*	*	6.10	8.95	*	*	*	8.95
	4	24.25	*	*	*	*	24.25	38.31	*	*	67.36	105.67
	5		*	3.46	*	*	3.46	63.08	*	*	*	63.08
	6	6.18	*	*	*	*	6.18	19.46	*	*	*	19.46
	7	6.69	*	3.15	*	*	9.84	29.88	*	*	*	29.88
	8	8.38	*	*	*	*	8.38	12.07	*	*	*	12.07
	9	*	*	*	*	*	*	22.13	*	*	*	22.13
	10	*	*	*	*	*	*	35.08	*	*	*	35.08
	11	*	*	*	*	*	*	30.24	*	*	*	30.24
	12	14.06	*	*	*	*	14.06	64.96	*	*	26.91	91.87

**Tablo 2b.** KOK tespit edilen sediment örneklerinin alındıkları aylar ve tespit edilen miktarları  
**Table 2b.** POP detected sediment samples, collected months and their concentrations

İstasyon	Ay	Konsantrasyonlar (ng/g)										Toplam DDT	
		PCB 101	PCB 153	PCB 138	PCB 180	PCB 118	Toplam PCB	4,4'-DDE	4,4'-DDD	2,4'-DDT	4,4'-DDT		
İ2	1	7.25	*	*	*	*	7.25	8.63	*	*	*	8.63	
	2		*	5.71	*	*	5.71	35.49	*	*	*	35.49	
	3	5.07	*	*	*	*	5.07	11.67	*	*	*	11.67	
	4	10.64	*	*	*	*	10.64	17.44	*	*	*	17.44	
	5	10.04	*	*	*	*	10.04	6.39	*	*	*	6.39	
	8	*	*	*	*	*	0.00		*	*	*	0.00	
	9	6.96	*	*	*	*	6.96	6.56	*	*	*	6.56	
	10	*	*	4.00	*	*	4.00	29.51	*	*	*	29.51	
	11	7.39	*	*	*	*	7.39	21.01	20.01	*	*	41.02	
	12	*	*	*	*	*	0.00	19.10	*	*	*	19.10	
	İ3	1	9.87	*	5.42	*	*	15.28	17.53	*	*	*	17.53
		2	6.65	*	*	*	*	6.65	51.72	*	*	11.57	63.29
3		*	*	3.11	*	*	3.11	48.67	*	*	*	48.67	
4		14.64	*	*	*	*	14.64	116.09	33.24	*	59.08	208.41	
5		7.55	*	3.77	*	*	11.32	581.74	64.17	69.09	*	715.00	
6		8.88	*	6.97	*	*	15.85	19.14	*	*	*	19.14	
7		12.51	*	*	*	*	12.51	242.58	41.18	56.39	*	340.16	
8		*	*	*	*	*	0.00	15.79	*	*	84.70	100.49	
9		10.31	*	*	*	*	10.31	16.66	*	*	56.98	73.64	
10		*	*	*	*	*	0.00	67.13	9.22	*	85.40	161.75	
11		7.32	*	6.72	*	*	14.04	87.72	*	*	*	87.72	
12		*	*	*	*	*	0.00	62.46	*	*	*	62.46	
İ4	1	7.54	*	*	*	*	7.54	20.96	*	*	*	20.96	
	2	*	6.19	8.51	*	*	14.70	30.02	*	*	66.21	96.23	
	3	7.00	10.77	11.18	*	*	28.96	19.77	*	*	*	19.77	
	4	11.25	*	5.10	*	*	16.35	36.89	12.52	*	*	49.41	
	5	*	6.33	7.26	*	*	13.59	28.63	*	*	*	28.63	
	6	12.47	11.48	16.39	5.63	*	45.98	54.05	*	*	65.44	119.49	
	7	*	*	5.08	*	*	5.08	35.19	*	*	*	35.19	
	8	8.03	16.56	17.69	7.69	7.52	57.50	34.70	*	*	36.13	70.83	
	9	11.82	*	4.53	*	*	16.36	17.33	*	*	*	17.33	
	10	*	6.29	9.91	*	*	16.20	24.32	*	*	*	24.32	
	11	12.78	*	3.73	*	*	16.52	39.21	*	*	*	39.21	
	12	129.67	15.28	18.59	6.94	*	170.47	75.28	*	*	20.64	95.92	
İ5	1	*	*	*	*	*	0.00	20.69	*	*	*	20.69	
	2	6.18	*	*	*	*	6.18	8.35	*	*	*	8.35	
	3	*	*	*	*	*	0.00	5.70	*	*	*	5.70	
	4	14.44	*	*	*	*	14.44	10.24	*	*	*	10.24	
	5	12.75	*	*	*	*	12.75	14.18	*	*	*	14.18	
	6	8.39	*	*	*	*	8.39	191.61	16.49	*	*	208.10	
	7	*	*	6.27	*	*	6.27	31.46	*	*	*	31.46	
	8	6.24	*	*	*	*	6.24	10.67	*	*	*	10.67	
	9	10.76	*	*	*	*	10.76	12.67	*	*	*	12.67	
	10	*	*	*	*	*	0.00	17.88	*	*	36.28	54.16	
	11	9.04	*	*	*	*	9.04	7.21	*	*	*	7.21	
	12	11.90	*	*	*	*	11.90	15.57	*	*	*	15.57	

Hem su hem de sediment örneklerinde en sık karşılaşılan OCP'nin 4,4'-DDE olduğu gözlenmiştir. Kullanımı sonrası ekosisteme karışan 4,4'-DDT'nin deklorinasyona uğrayarak 4,4'-DDE'ye dönüştüğü ve bunun uzun zaman alan bir süreç olduğu bildirilmiştir (Aguilar 1984). Tespit edilen DDT/DDE oranının ise DDT'nin kullanım zamanının belirlenmesi için önemli bir araç olduğu belirtilmiştir (Noel ve ark. 2018). Aynı istasyonlardan alınan sediment örneklerinde tespit edilen DDT miktarlarının DDE miktarlarından düşük olması DDT birikiminin yakın zamanda olmadığını işaret etmektedir. Su örneklerinde DDT tespit edilemeyip sadece 4,4'-DDE bulunması da bunu destekler niteliktedir. İngiltere, Hindistan ve Çin'de yapılan benzer çalışmalarda, tespit edilen toplam PCB ve OCP konsantrasyonlarının, buharlaşmaya bağlı olarak yaz mevsiminde arttığı bildirilmiştir (Meharg ve ark. 2003, Malik ve ark. 2006, You ve ark. 2011). Mevcut çalışmada toplam PCB ve 4,4'-DDE konsantrasyonlarının en yüksek seviyelerine Ağustos ayında çıkması belirtilen çalışmalardaki sonuçlarla uyumludur.

Örneklerin toplandığı İ3 öncesindeki alan geniş tarım arazilerinin bulunduğu bir bölgedir. Yasaklanmasına kadarki dönemde tarım zararlılarıyla mücadele amacıyla DDT'nin yaygın olarak kullanılmış olması bu istasyondan alınan sediment örneklerindeki DDT türevlerinin konsantrasyonlarının diğer istasyonlara göre yüksek çıkmasını açıklar niteliktedir. Bir sonraki istasyon olan İ4'ten alınan sediment örneklerinde PCB konsantrasyonunun yüksek çıkmasının, nehir üzerinde bu istasyondan önce yer alan Makine ve Kimya Endüstrisi Kurumu (MKE)'na ait barut ve silah fabrikalarından PCB salınımına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Bunun doğrulanabilmesi için bu fabrikaların nehre açılan atık su deşarjlarından örnek alınarak incelenmesinin yararlı olacağı değerlendirilmektedir. Kirlilik kaynaklarının kesin olarak ortaya konulabilmesinin uygun atık su arıtma sistemlerinin kullanılarak nehre taşınan kirlenici madde miktarının azaltılmasında faydalı olabileceği düşünülmektedir.

## SONUÇ

Mevcut çalışmada Kızılırmak Nehri üzerinde seçilen 5 farklı istasyondan toplanan 60'şar su ve sediment örneğinde KOK konsantrasyonu ve mevsimlere göre değişimi araştırılmıştır. Örneklerde en sık 4,4'-DDE ve PCB101 tespit edilmiştir. Su örneklerinde mevsimsel farklılıklar öne çıkarken sediment örneklerinde istasyonlar arasındaki farklılık dikkat çekmektedir. Geniş bir alanı sulayan Kızılırmak Nehri'ndeki KOK kalıntılarının miktarlarının düzenli olarak takip edilmesinin çevre ve sağlık açısından oluşabilecek risklerin yönetilebilmesi açısından gerekli olduğu düşünülmektedir.

- Aguilar A.** Relationship of DDE/ΣDDT in marine mammals to the chronology of DDT input into the ecosystem. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1984; 41(6): 840-844.
- Carpenter DO.** Health effects of persistent organic pollutants: the challenge for the Pacific Basin and for the world. *Reviews on Environmental Health*. 2011; 26(1): 61-9.
- GoogleMaps**  
<https://www.google.com/maps/@39.8397519,33.4605956,12.25z> (19.08.2019).
- Kelly BC, Ikonomou MG, Blair JD, Morin AE, Gobas FAPC.** Food web-specific biomagnification of persistent organic pollutants. *Science*. 2007; 317(5835): 236-239.
- Kuzukiran O, Yurdakok-Dikmen B, Sevin S, Sireli UT, Iplikcioglu-Cil G, Filazi A.** Determination of selected endocrine disruptors in organic, free-range, and battery-produced hen eggs and risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018; 25(35): 35376-35386.
- Kuzukiran O, Yurdakok-Dikmen B, Totan FE, Celik C, Orhan EC, Bilir EK, Kara E, Filazi A.** Analytical method development and validation for some persistent organic pollutants in water and sediments by gas chromatography mass spectrometry. *International Journal of Environmental Research*. 2016; 10(3): 401-410.
- Magnusson B, Ornemark U.** The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. 2014; 57.
- Malik A, Ojha P, Singh KP.** Levels and distribution of persistent organochlorine pesticide residues in water and sediments of Gomti River (India)-a tributary of the Ganges River. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2009; 148(1-4): 421-435.
- Meharg AA, Wright J, Leeks GJL, Wass PD, Owens PN, Walling DE, Osborn D.** PCB congener dynamics in a heavily industrialized river catchment. *Science of the total environment*. 2003; 314: 439-450.
- Noël M, Loseto LL, Stern G.** Legacy contaminants in the eastern Beaufort Sea beluga whales (*Delphinapterus leucas*): are temporal trends reflecting regulations?. *Arctic Science*. 2018; 4(3): 373-387.
- R Core Team (2014).** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/> Erişim tarihi: 22.09.2019.
- Ren X, Zeng G, Tang L, Wang J, Wan J, Liu Y, Yu J, Yi H, Ye S, Deng R.** Sorption, transport and biodegradation—an insight into bioavailability of persistent organic pollutants in soil. *Science of the Total Environment*. 2018; 610: 1154-1163.
- Sousa JC, Ribeiro AR, Barbosa MO, Pereira MFR, Silva AMT.** A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *Journal of Hazardous Materials*. 2018; 344: 146-162.
- Sun P, Backus S, Blanchard P, Hites RA.** Temporal and spatial trends of organochlorine pesticides in Great Lakes precipitation. *Environmental Science and Technology*. 2006; 40: 2135-2141.
- WHO.** [https://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/chemical-risks/pops/en/](https://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/pops/en/); Erişim tarihi: 22.09.2019.
- You H, Ding J, Zhao XS, Li YF, Liu LY, Ma WL, Qi H, Shen, JM.** Spatial and seasonal variation of polychlorinated biphenyls in Songhua River, China. *Environmental geochemistry and health*. 2011; 33(3): 291-299.

## Abattoir-Based Survey of Mastitis in Cattle in Afyonkarahisar Province

Erhan ÖZENÇİ<sup>1\*</sup>, Esra ŞEKER<sup>2</sup>, Müesser YILMAZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynaecology, Afyonkarahisar, 03030, Turkey

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Afyonkarahisar, 03030, Turkey

### ABSTRACT

The aim of this study was to estimate the incidence of mastitis and to determine causative agents of mastitis in cattle at an abattoir. The present study was carried out on the 416 mammary quarters of 104 heifers and cows. Animals with clinical mastitis and no clinical signs of mastitis were noted. Since 54 mammary quarters were blind, non-functional and had papillomas, milk samples were not collected. A total of 362 quarter milk samples were aseptically collected from the animals and submitted to microbiology laboratory for bacterial identification. In 62 milk samples with clinical mastitis, 33 clinical mastitis samples (53.23%) were culture positive, while 29 of clinical mastitis samples (46.77%) yielded no growth. In 300 milk samples with non-clinical mastitis, 124 milk samples (41.33%) were culture positive (subclinical mastitis), whereas 176 (58.67%) milk samples were culture negative. In clinical mastitis, the most frequently isolated species were Coagulase-negative Staphylococci (CNS) (17.74%), followed by *Escherichia coli* (8.06%), *Staphylococcus aureus* (6.45%), *Corynebacterium ulcerans* (6.45%) and *Candida* spp. (6.45%). In subclinical mastitis, the most commonly isolated species were CNS (47.58%), followed by *Candida* spp. (15.32%) and *Corynebacterium bovis* (5.65%). Among the CNS, the most common species was *Staphylococcus capitis*. In conclusion, the rate of mastitis among the animals examined at an abattoir was quite highly. To our knowledge, this is the first study to describe the bacterial agents causing mastitis at an abattoir in Afyonkarahisar.

**Keywords:** Etiology, Bovine mastitis, Abattoir, Prevalence

\*\*\*

### Afyonkarahisar İlinde Sığırlarda Mezbara Bazlı Mastitis Taraması

#### ÖZ

Sunulan çalışmada çeşitli nedenlerle sürüden uzaklaştırılan dişi hayvanlarda mastitis insidensinin ve mastitise neden olan etkenlerin belirlenmesi amaçlandı. Çalışma 104 inek ve düveye ait toplam 416 meme lobu üzerinde gerçekleştirildi. Klinik mastitisli ve sağlıklı gözükten meme lobları kayıt edildi. Kör, fonksiyonel olmayan ve papilloma saptanan 54 adet meme lobuna ait süt numuneleri alınmadı. Aseptik koşullarda toplam 362 meme lobuna ait süt numunesi bakteriyel identifikasyon amacı ile mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Altmış iki adet klinik mastitisli meme lobuna ait süt numunelerinin 33'ünde (%53,23) üreme saptanırken, 29'unda (%46,77) üreme saptanamadı. Klinik mastitisli olmayan 300 meme lobu süt örneğinin 124'ünde (%41,33) üreme belirlenirken (subklinik mastitis), 176 tanesinde (%58,67) üreme belirlenemedi. Klinik mastitis olgularında en sık izole edilen mikroorganizmaların Koagülaz negatif Stafilokoklar (KNS) (%17,74) olduğu ve bunu sırasıyla *Escherichia coli* (%8,06), *Staphylococcus aureus* (%6,45), *Corynebacterium ulcerans* (%6,45) ve *Candida* spp.'nin (%6,45) takip ettiği saptandı. Subklinik mastitis olgularından en sık izole edilen mikroorganizmaların ise KNS türleri (%47,58) olduğu ve bunu sırasıyla *Candida* spp. (%15,32) ve *Corynebacterium bovis*'in (%5,65) izlediği belirlendi. KNS türleri arasında en yaygın etkenin *Staphylococcus capitis* olduğu tespit edildi. Sonuç olarak, mezbaraya çeşitli nedenlerle kesim amacıyla getirilen dişi hayvanlarda mastitis oranları oldukça yüksek olarak saptandı. Sunulan çalışma, Afyonkarahisar bölgesinde mezbara şartlarında mastitise neden olan etkenlerin belirlenmesine yönelik ilk çalışmadır.

**Anahtar Kelimeler:** Etiyoloji, Mastitis, Mezbara, Prevalans

To cite this article: Özenç E, Şeker E, Yılmaz M. Abattoir-Based Survey of Mastitis in Cattle in Afyonkarahisar Province. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4):437-442.

Submission: 18.09.2019 Accepted: 01.11.2019 Published Online: 24.11.2019

ORCID ID; EÖ: 0000-0002-9179-8796, EŞ: 0000-0003-0969-5286, MY: 0000-0003-3179-5523

\*Corresponding author e-mail: erhanankara@hotmail.com

## GİRİŞ

Günümüzde bilimsel ilerlemelere rağmen mastitis dünyanın birçok bölgesinde çiftlik hayvanı yetiştiriciliğinde yaygın ve çözümünü pahalı olan bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu hastalığa yakalanan birçok hayvan ise zorunlu olarak kesime sevk edilmektedir. Tüm ineklerin üçte birinin meme loblarından birisi veya birkaçının bu hastalık ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Hastalığa neden olan etkenlerin identifikasyonu ve uygun antibiyotik seçiminin yanı sıra, mastitis kontrol programları da korunmada çok önemli bir rol oynamaktadır (Philpot ve Nickerson 1991, Bradley 2002, Gao ve ark. 2017).

Mastitis olguları üzerinde yapılan çalışmalar daha çok sürü taraması şeklinde gerçekleştirilmiştir (Östenson ve ark. 2013, Katsande ve ark. 2013). Mastitise bağlı olarak süt verim kaybı olan hayvanların mezbahaya sevk edilme süreleri, kaliteli süt üretimi yapan hayvanlara göre daha kısadır (Shinozuka ve ark. 2016). Bununla birlikte özellikle kronik mastitis olgularının ovaryum fonksiyonlarında bozukluklara sebep olarak fertilitiyi olumsuz yönde etkilediği bildirilmektedir (Rahman ve ark. 2012). Kesime sevk edilen hayvanlarda gözlemlenen mastitis olgularında genellikle mastitis patojeni olarak sık karşılaşılan etkenlerin tek başlarına izolasyonlarına yönelik çalışmalar bulunmasına rağmen (Piccinini ve ark. 2012, Shinozuka ve ark. 2016), kesimi yapılan hayvanlarda gözlemlenen mastitise neden olan etkenlerin tümünün izolasyon ve identifikasyonuna ait sınırlı bir bilgi birikimi vardır (Rahman ve ark. 2012). Ayrıca, sürü dışı bırakılarak mezbahaya yönlendirilen hayvanlarda gözlemlenen mastitislerin prevalansına ait bilgi sınırlı düzeydedir (Edwards ve ark. 1995, Cadmus ve Adesokan, 2009). Afyonkarahisar ili sınırları içerisinde ise herhangi bir sebep ile sürü dışına bırakılarak mezbahaya sevk edilen hayvanlardaki mastitis olgularının belirlenmesi ve bu hastalığa yol açan etkenlerin identifikasyonuna yönelik bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Afyonkarahisar'da mezbahada kesimi yapılan hayvanlarda (1) mastitis insidensinin ve (2) mastitise neden olan etkenlerin belirlenmesi amaçlandı.

## MATERYAL ve METOT

### Hayvanların seçimi

Bu çalışma, Afyonkarahisar ili merkezinde bulunan özel bir mezbahaya çeşitli nedenlerle kesim için getirilen, 2-15 yaş aralığında (ortalama  $4,79 \pm 2,54$ ), değişik ırklarda inek ve düvelerden oluşan toplam 104 hayvana ait 416 meme lobu incelenerek yapıldı. Kesimhaneye getirilen hayvanların kulak küpelerinden elde edilen bilgiler ile yaşları ve ırkları doğrulandı. Bu hayvanlar çoğunlukla hayvan pazarlarından başka kimseler tarafından satın alınarak kesimhaneye getirilmeleri nedeniyle, hayvanların hangi sebeplerle kesime sevk edildikleri belirlenemedi.

### Meme loblarının ve sütün ön muayenesi, süt örneklerinin toplanması ve bakteriyolojik muayene

Kesim öncesinde padoklarda dinlenmeye bırakılan hayvanların ilk olarak meme lobu bazında inspeksiyonları ve palpasyon muayeneleri yapıldı. Klinik mastitisli olan hayvanların meme lobları kızarıklık, ödem, ağrı ve sertlik yönünden değerlendirilirken, sütler ise pıhtı varlığı, sulanma ve renk değişikliği yönünden kontrol edildi (Vural ve ark. 2016). Ayrıca, fonksiyonel olmayan, kör ve papillomlu meme lobları kayıt altına alındı ve bu meme loblarından süt örnekleri alınmadı (n=54). Subklinik mastitislerin belirlenmesinde ise mikrobiyolojik muayene altın standart olarak kullanıldı.

Süt örnekleri alınmadan önce meme başları %70'lik alkol ile temizlendi ve kurutuldu. İlk sıkmış süt dışarı sağıldıktan hemen sonra 10 ml süt örneği steril tüplere aseptik şartlar altında alındı. Örnekler soğuk zincir altında hemen laboratuvara iletildi. Her bir süt örneğinden 10 mikrolitre alınarak %7'lik koyun kanı içeren kanlı agara, Sabouraud Dekstroz agara (SDA) ve MacConkey (MC) agara ekimler yapıldı. Kanlı agar ve MC agar petripleri 37 °C'de aerobik koşullarda 24-48 saat, SDA petripleri ise 24 °C'de 5-7 gün süre ile inkübe edildi. Uygun süre sonunda besiyerlerinde üreyen koloniler makroskopik (koloni morfolojisi, hemoliz vs.) ve mikroskopik (Gram boyanma özelliği) olarak değerlendirildi (İzgür 1999, Leloğlu 1999; Vural ve ark. 2016). Etkenlerin kesin identifikasyonları ticari identifikasyon kiti (BD, Becton Dickson and Company, USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

## BULGULAR

Sunulan çalışmada mezbahaya getirilen 104 hayvanın toplam 416 meme lobunun tamamı fonksiyonel değildi. Bu meme başlarından 43'ünün kör, 8'inin fonksiyonel olmaması ve 3'ünde papillom olduğundan dolayı toplam 54 meme lobundan süt örnekleri alınamadı ve bu örnekler veri elde edilemediği için çalışmaya dahil edilmedi. Geriye kalan 362 meme lobunda yapılan incelemede; 62 (%17,13) meme lobunda klinik mastitis belirlenirken, 300 meme lobunda ise klinik olarak herhangi bir anormallik gözlenmedi.

Klinik mastitisli 62 meme lobuna ait süt numunelerinden 33'ünde (%53,23) mikrobiyolojik üreme gözlenirken, 29'unda (%46,77) üremenin olmadığı belirlendi. Klinik mastitis olmayan meme loblarına ait süt numunelerinin ise 124'ünde (%41,33) üreme belirlenirken (subklinik mastitis), 176'sında (%58,67) üreme belirlenemedi. Klinik mastitis olgularında en sık izole edilen mikroorganizmaların koagülaz negatif Stafilokoklar (KNS) (%17,74) olduğu ve bunu sırasıyla *Escherichia coli* (%8,06), *Staphylococcus aureus* (%6,45), *Corynebacterium ulcerans* (%6,45) ve *Candida* spp.'nin (%6,45) takip ettiği saptandı (Tablo

1). KNS türleri arasında en sıklıkla *Staphylococcus capitis* (%54,55) izole edildi (Tablo 3).

Memede ve sütte herhangi bir bozukluğa ait klinik belirti göstermeyen 300 süt örneğinden 124 (%41,33) tanesinde mikrobiyolojik üreme saptandı ve subklinik mastitis teşhisi konuldu. Bu hayvanlar inek ve düve bazında ayrı olarak incelendi. Bu olgular içerisinde ineklerde en sık izole edilen mikroorganizmanın KNS türleri (%34,38) olduğu ve bunu sırasıyla *Candida* spp.

(%18,75) ve *Corynebacterium bovis*'in (%7,29) izlediği belirlendi (Tablo 2). KNS türleri arasında en sıklıkla *Staphylococcus capitis* (%60,61) izole edildi (Tablo 3). Düvelerin hiçbirisinde klinik mastitis bulgusu gözlenmezken, düve mastitislerinden en sık izole edilen etkenler KNS türleri (%92,86) olarak belirlendi (Tablo 2). *S. capitis*'in (%61,54) düvelerden izole edilen KNS türleri arasında en yaygın tür olduğu tespit edildi (Tablo 3).

**Tablo 1.** Mezbahada saptanan 62 adet klinik mastitisli süt örneğinden izole edilen patojenlerinin dağılımı  
**Table 1.** Distribution of pathogens isolated from 62 clinical mastitis samples at abattoir

Mikroorganizma	Klinik mastitis	
	Sayı	%
Koagülaz negatif Stafilokoklar (KNS)	11	17,74
<i>Escherichia coli</i>	5	8,06
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	6,45
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	4	6,45
<i>Candida</i> spp.	4	6,45
<i>Streptococcus uberis</i>	2	3,23
<i>Corynebacterium bovis</i>	1	1,61
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1,61
<i>Micrococcus luteus</i>	1	1,61
Mikrobiyolojik üreme olmayanlar	29	46,77
<b>Toplam</b>	<b>62</b>	<b>100</b>

**Tablo 2.** Mezbahada saptanan 124 adet subklinik mastitisli süt örneğinden izole edilen patojenlerin dağılımı  
**Table 2.** Distribution of pathogens isolated from 124 subclinical mastitis samples at abattoir

Mikroorganizma	Subklinik mastitis (İnek)		Subklinik mastitis (Düve)		Toplam (İnek ve düve)	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
	Koagülaz negatif Stafilokoklar (KNS)	33	34,38	26	92,86	59
<i>Candida</i> spp.	18	18,75	1	3,57	19	15,32
<i>Corynebacterium bovis</i>	7	7,29	-	-	7	5,65
<i>Escherichia coli</i>	5	5,21	-	-	5	4,03
<i>Micrococcus luteus</i>	5	5,21	-	-	5	4,03
<i>Streptococcus uberis</i>	4	4,17	-	-	4	3,23
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3,13	-	-	3	2,42
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	3,13	-	-	3	2,42
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	3	3,13	-	-	3	2,42
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	2,08	-	-	2	1,61
<i>Enterococcus solitarius</i>	2	2,08	-	-	2	1,61
<i>Leuconostoc citreum</i>	2	2,08	-	-	2	1,61
<i>Streptococcus bovis</i>	1	1,04	-	-	1	0,81
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	1,04	-	-	1	0,81
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1	1,04	-	-	1	0,81
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	1	1,04	-	-	1	0,81
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>	1	1,04	-	-	1	0,81
İdentifiye edilemedi	4	4,17	1	3,57	5	4,03
<b>Toplam</b>	<b>96</b>	<b>100</b>	<b>28</b>	<b>100</b>	<b>124</b>	<b>100</b>

**Tablo 3.** Klinik ve subklinik mastitisli süt örneklerinden izole edilen koagülaz negatif Stafilocokların dağılımı  
**Table 3.** Distribution of coagulase-negative Staphylococci isolated from clinical and subclinical mastitis samples

Türler	Klinik mastitis	Subklinik mastitis (İnek)	Subklinik mastitis (Düve)
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
<i>Staphylococcus capitis</i>	6 (54,55)	20 (60,61)	16 (61,54)
<i>Staphylococcus simulans</i>	2 (18,18)	3 (9,09)	2 (7,69)
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	1 (9,09)	2 (6,06)	6 (23,08)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1 (9,09)	1 (3,03)	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 (9,09)	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	3 (9,09)	-
<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	-	3 (9,09)	1 (3,85)
<i>Staphylococcus lentus</i>	-	1 (3,03)	-
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	-	-	1 (3,85)
<b>Toplam</b>	11 (100)	33 (100)	26 (100)

## TARTIŞMA

Dünyada ve ülkemizde klinik mastitislere neden olan etkenlerin belirlenmesine yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Wisconsin eyaletindeki 50 süt işletmesinde klinik mastitislerin etiyolojilerini belirlenmeye yönelik yapılan bir çalışmada, meme lobu bazında klinik mastitis belirlenen 741 süt örneğinden 539'unda (%72,74) mikrobiyolojik üreme belirlenirken, 202'sinde (%27,26) bakteri izole edilemediği bildirilmektedir (Oliveira ve ark. 2013). Aynı araştırmacılar klinik mastitis olgularında en fazla oranda izole ettikleri mikroorganizmanın *E. coli* (%22,54) olduğunu ve bunu sırasıyla çevresel Streptokokların (%12,82), *Klebsiella* spp. (%6,88) ve KNS türlerinin (%6,07) takip ettiğini belirlemiştir. Pinzon-Sanchez ve Ruegg (2011) tarafından yine Wisconsin'de 143 klinik mastitisli meme lobu üzerinde yapılan bir çalışmada, meme loblarının 83'ünde (%58) üreme saptandığı, 60 adetinde (%42) ise üreme olmadığı bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar klinik mastitisli süt örneklerinden en fazla *E. coli* (%9,79) izole ettiklerini ve bunu sırasıyla *Klebsiella* spp. (%7,69) ve *Streptococcus dysgalactiae*'nin (%6,99) izlediğini tespit etmişlerdir. Çin'de 161 çiftlikte meme lobu bazında 3288 klinik mastitis olgusu üzerinde yapılan başka bir çalışmada, süt örneklerinin 2767'sinden (%84,15) bakteriyel izolasyon gerçekleştirildiği, 521 (%15,85) örnekte ise bakteri izole edilemediği bildirilmiştir (Gao ve ark. 2017). Gao ve ark. (2017) aynı çalışmada, klinik mastitis olgularından en fazla izole edilen etkenin *E. coli* (%14,39) olduğunu, bunu sırasıyla *Klebsiella* spp. (%12,96), KNS türleri (%11,31) ve *S. dysgalactiae*'nin (%10,52) izlediğini vurgulamışlardır. Olde Riekerink ve ark. (2008) tarafından Kanada'da 3033 klinik mastitis vakası üzerinde yapılan bir çalışmada, örneklerin 1703'ünden (%56,15) etken izole edilirken, 1330'unda (%43,85) mikrobiyolojik üreme saptanamadığı belirtilmiş, tüm klinik mastitis olguları

içerisinde en yüksek izolasyon oranına *S. aureus*'un (%10,29) sahip olduğu ve bunu sırasıyla *E. coli* (%8,37) ve *Streptococcus uberis*'in (%6,30) takip ettiği bildirilmiştir. Yeni Zelanda'da yapılan bir başka çalışmada ise klinik mastitisli meme loblarının %22,30'undan bakteri izole edilemediği vurgulanmıştır (McDougall 1999). Türkiye'de Gülcü ve Ertaş (2004), Elazığ ilinde mezbahada California Mastitis Testi (CMT) pozitif ve klinik mastitisli hayvanlardan aldıkları süt numunelerinde en yüksek oranda *S. aureus*'un (%39,04) izole edildiğini ve bunu da sırasıyla *Staphylococcus epidermidis* (%17,81) ve *Trueperella pyogenes*'in (%14,38) takip ettiğini saptamışlardır. Sunulan çalışmada klinik mastitis saptanan hayvanlarda diğer çalışmalarda bildirilen oranlardan daha düşük (%53,23) mikrobiyolojik üreme elde edildi. KNS türlerinin klinik mastitis olgularındaki prevalans değerlerinin %6-30 arasında değiştiği bildirilmekle birlikte (Krishnamoorthy ve ark. 2016), bu çalışmada en yüksek izolasyon oranına sahip etkenlerin KNS türleri (%17,74) olması dikkat çekiciydi. Elde edilen mikrobiyal izolasyon oranının düşük olmasının, örneklenen hayvanların mezbahaya gelinceye kadar nonspesifik ve yaygın antibiyotik uygulamasına maruz kalması ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Genellikle, mastitis etiyolojisine yönelik çalışmalarda etkenlerin tür bazında değerlendirmeye alınmadığı ve çalışmaların çoğunlukla *S. aureus* üzerine yoğunlaştığı bilinmektedir. Bu çalışmada, elde edilen izolatların tür bazında da identifiye edilmiş olmasının, KNS türlerinin yüksek izolasyon oranı üzerinde etkili olabileceği düşünüldü.

Subklinik mastitislerin belirlenmesinde birçok farklı yöntem kullanılmakla birlikte çoğunlukla CMT ve/veya sütlerden direkt olarak mikrobiyolojik muayene yapılarak da tanıya gidilebilmektedir (Ozenc ve ark. 2008; Ozenc ve ark. 2018; Ozenc ve ark. 2019). Sunulan çalışmada da subklinik mastitislerin saptanmasında bakteriyolojik bulgular altın standart olarak belirlendi. Kırıkkale ilinde subklinik mastitis olgularının tespit edilmesi amacıyla yapılan bir

çalışmada, CMT pozitif süt örneklerine yapılan mikrobiyolojik muayenede yüksek oranda KNS (%37,56) ve *S. aureus* (%28,17) izole edildiği bildirilmiştir (Macun ve ark. 2011). Hatay ilinde yapılan başka bir çalışmada da CMT pozitif süt örneklerinde en fazla oranda KNS (%42,4) izole edildiği ve bunu sırasıyla *S. aureus* (%25,2) ve *Streptococcus uberis*'in (%11,3) izlediği belirtilmiştir (Ergün ve ark. 2004). Rışvanlı ve Kalkan (2002) tarafından Türkiye'de yapılan diğer bir çalışmada ise subklinik mastitis olgularında en yüksek oranda *S. aureus* (%67,17) izole edildiği bildirilmiştir. Sunulan çalışmada, Macun ve ark. (2011) ile Ergün ve ark. (2004) tarafından bildirilen yüksek KNS oranlarına benzer şekilde, üreyen etkenler içerisinde en yüksek izolasyon oranına sahip türlerin KNS türleri (%47,58) olduğu belirlendi. KNS türlerinin daha çok subklinik mastitisler ile ilişkili olduğu bildirilmekle birlikte, konakçı üzerindeki mekanizmaları hala aydınlatılabilmiş değildir (Krishnamoorthy ve ark. 2016).

Meme loblarından izole edilen KNS türlerinin saptanmasına yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. Düvelerde doğum öncesi ve sonrasında görülen mastitislerin nedenlerinin belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada, mastitisli meme loblarında en fazla oranda KNS türlerinin belirlendiği ve bunlar içerisinde de *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus xylosus* ve *Staphylococcus chromogenes* türlerinin daha yüksek oranda izole edildiği bildirilmiştir (Myllys 1995). Piessens ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, altı farklı çiftlikten meme lobu düzeyinde alınan süt numunelerinden izole edilen KNS türleri içerisinde en yüksek izolasyon oranına sahip türlerin *S. chromogenes* (%30,6) ve *Staphylococcus haemolyticus* (%27,6) olduğu vurgulanmıştır. Sunulan çalışmada ise klinik ve subklinik mastitis olgularından izole edilen KNS türleri içerisinde en yüksek izolasyon oranına sahip tür *S. capitis* olarak belirlendi. Hayvanların üzerinde yaşadıkları değişik coğrafyaların, hayvanların ırk farklılıklarının, mastitis veya farklı infeksiyonların tedavilerinde kullanılan antibiyotiklerin bölge ve ülkeler bazında farklılıklar göstermesinin, çalışmada elde edilen baskın ve farklı KNS türleri üzerinde etkili olabileceği düşünüldü.

## SONUÇ

Sonuç olarak, mezbahaya çeşitli nedenlerle kesim amacıyla getirilen dişi hayvanların meme lobları düzeyindeki klinik ve subklinik mastitis oranlarının yüksek olduğu tespit edildi. Hem klinik hem de subklinik mastitis olguları içerisinde ise en fazla izole edilen bakteri grubunun KNS türleri olduğu belirlendi. Elde edilen bu sonuç, Afyonkarahisar ilindeki süt işletmelerinde mastitis kontrol programlarının tekrar gözden geçirilmesinin ve KNS

türlerine karşı gerekli tedbirlerin alınmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

## TEŞEKKÜR

*Bu araştırma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 17.KARİYER.67 nolu proje ile desteklenmiştir.*

*Sunulan çalışma 2. Uluslararası Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresinde poster bildiri olarak sunulmuştur.*

*Bu araştırma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (AKÜHADYEK-201-17-Referans nolu araştırma, sayı:49533702/72).*

## KAYNAKLAR

- Bradley A.** Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet J.* 2002; 164:116-128.
- Cadmus SI, Adesokan HK.** Causes and implications of bovine organs/offal condemnations in some abattoirs in Western Nigeria. *Trop Anim Health Prod.* 2009; 41(7):1455-1463.
- Edwards JF, Simpson RB, Brown WC.** Bacteriologic culture and histologic examination of samples collected from recumbent cattle at slaughter. *J Am Vet Med Assoc.* 1995; 207(9):1174-1176.
- Ergün Y, Aslantaş Ö, Doğruer G, Cantekin Z.** Hatay ilindeki aile tipi süt sığırcılığı işletmelerinde subklinik mastitislerin epidemiyolojisi. *Vet Bil Derg.* 2004; 20(4):25-28.
- Gao J, Barkema HW, Zhang L, Liu G, Deng Z, Cai L, Shan R, Zhang S, Zou J, Kastelic JP, Han B.** Incidence of clinical mastitis and distribution of pathogens on large Chinese dairy farms. *J Dairy Sci.* 2017; 100(6):4797-4806.
- Gülcü HB, Ertaş HB.** Elazığ yöresinde mezbahada kesilen ineklerde mastitisli meme loblarının bakteriyolojik incelemesi. *Turk J Vet Anim Sci.* 2004; 28:91-94.
- İzgür M.** Fakültatif anaerobik Gram negatif çomaklar. Enterobacteriaceae familyası, In: Özel Mikrobiyoloji, Ed; Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS, 5. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, Türkiye. 1999; pp. 45-58.
- Katsande S, Matope G, Ndengu M, Pfukenyi DM.** Prevalence of mastitis in dairy cows from smallholder farms in Zimbabwe. *Onderstepoort J Vet. Res.* 2013; 80(1):Art. 523.
- Krishnamoorthy P, Satyanarayana ML, Shome BR.** Coagulase negative staphylococcal species mastitis: an overview. *Res J Vet Sci.* 2016; 9(1):1-10.
- Leloğlu N.** Gram pozitif koklar, In: Özel Mikrobiyoloji, Ed; Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS, 5. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, Türkiye. 1999; pp. 31-44.
- Macun HC, Pir Yağcı İ, Ünal N, Kalender H, Sakarya F, Yıldırım M.** Kırıkkale'de belirlenen subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve antibiyotik direnç durumu. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 2011; 8(2):83-89.
- McDougall S.** Prevalence of clinical mastitis in 38 Waikato dairy herds in early lactation. *N Z Vet J.* 1999; 47(4):143-149.
- Myllys V.** Staphylococci in heifer mastitis before and after parturition. *J Dairy Res.* 1995; 62(1):51-60.



- Olde Riekerink RGM, Barkema HW, Kelton DF, Scholl DT.** Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* 2008; 91(4):1366-1377.
- Oliveira L, Hulland C, Ruegg PL.** Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. *J Dairy Sci.* 2013; 96(12):7538-7549.
- Östensson K, Lam V, Sjögren N, Wredle E.** Prevalence of subclinical mastitis and isolated udder pathogens in dairy cows in Southern Vietnam. *Trop Anim Health Prod.* 2013; 45:979-986.
- Özenç E, Vural MR, Şeker E, Uçar M.** An evaluation of subclinical mastitis during lactation in Anatolian buffaloes. *Turk J Vet Anim Sci.* 2008; 32(5):359-368.
- Özenç E, Ergün Y, Cantekin Z, Vural MR.** Sütçü sürülerde mastitislerin tanısında kullanılan güncel yöntemler. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics.* 2018; 4(1):114-118.
- Özenç E, Şeker E, Baki Acar D, Koca HB, Yazıcı E, Çelik HA, Doğan N, Avcı G, Yılmaz O, Küçükkebaşı M, Uçar M, Baştan A.** Milk lactoferrin concentrations in Anatolian buffaloes with and without subclinical mastitis. *Buffalo Bull.* 2019; 38(2): 291-298.
- Piessens V, Van Coillie E, Verbist B, Supré K, Braem G, Van Nuffel A, De Vuyst L, Heyndrickx M, De Vliegher S.** Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *J Dairy Sci.* 2011; 94(6):2933-2944.
- Philpot WN, Nickerson SC.** Mastitis: Counter Attack. Babson Bros Co. Naperville, USA. 1991.
- Piccinini R, Tassi R, Daprà V, Pilla R, Fenner J, Carter B, Anjum MF.** Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. *J Dairy Res* 2012; 79(2):249-255.
- Pinzon-Sanchez C, Ruegg PL.** Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. *J Dairy Sci* 2011; 94(7):3397-3410.
- Rahman MM, Mazzilli M, Pennarossa G, Brevini TAL, Zecconi A, Gandolfi F.** Chronic mastitis is associated with altered ovarian follicle development in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2012; 95(4):1885-1893.
- Rişvanlı A, Kalkan C.** Sütçü ineklerde yaş ve ırkın subklinik mastitisli memelerin sütlerindeki somatik hücre sayıları ile mikrobiyolojik izolasyon oranlarına etkisi. *YYÜ Vet Fak Derg.* 2002; 13(1-2):84-87.
- Shinozuka Y, Kaneko S, Kurose T, Watanabe A, Kuruhara K, Kawai K.** Factors associated with marketable milk production recovery after treatment of naturally occurring acute coliform mastitis. *J Vet Med Sci.* 2016; 78(5):917-920.
- Vural MR, Ergün Y, Özenç E.** Büyük ruminantlarda mastitis, In: Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları, Ed; Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A. 1. Baskı, Medipres Matbaacılık Ltd. Şti., Malatya. 2016: pp. 149-247.

## The Prevalence of Gastrointestinal Helminths in Domestically Farmed Chicken in Van, Turkey

Vural DENİZHAN<sup>1</sup>, Ayşe KARAKUŞ<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Özalp Vocational High School, University of Van Yüzüncü Yıl, Van, Turkey

<sup>2</sup>Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Van Yüzüncü Yıl University, 65080, Van, Turkey

### ABSTRACT

The present study was conducted with the aim to determine the prevalence of gastrointestinal helminth in domestically farmed chicken in İpekyolu, Tuşba and Edremit districts in Van Province in Turkey. Feces of 185 chicken were examined and 78 chicken (42.16%) yielded positive results for single species, 26 (14.05%) were positive for two species, and 6 chicken (3.25%) were positive for three species. Six helminth eggs, four nematodes and two cestodes, were detected in infected chicken feces. Those infected with single species were studied based on helminth and infection types and the rates of infection was determined as: *Capillaria* spp. 23 (12.50%), *Heterakis gallinarum* 19 (10.32%), *Ascaridia* spp. 18 (9.78%), *Raillietina* spp. 8 (4.35%), *Davania proglottina* 6 (3.26%), *Trichostrongylus tenuis* 4 (2.17%). The infection determined in feces caused by two species were *Capillaria* spp. + *Heterakis gallinarum* 10 (5.43%), *Capillaria* spp. + *Ascaridia* spp. 8 (4.35%), *Heterakis gallinarum* + *Ascaridia* spp. 7 (3.78%), *Raillietina* spp. + *Davania proglottina* 1 (0.54%) and infection determined in feces caused by three species were determined as *Capillaria* spp. + *Heterakis gallinarum* + *Davania proglottina* 4 (2.17%) and *Capillaria* spp. + *Heterakis gallinarum* + *Trichostrongylus tenuis* 2 (1.09%). The findings of the present study indicated that helminth infections were significantly prevalent in domestic chicken in Van Province in Turkey.

**Keywords:** Gastrointestinal Helminths, Prevalence, Chicken, Van.

\*\*\*

### Van İlinde Ev Kümeslerinde Yetiştirilen Tavuklarda Gastrointestinal Helmintlerin Prevalansı

#### ÖZ

Bu çalışma Türkiye’de Van ili İpekyolu, Tuşba ve Edremit ilçelerinde yetiştirilen ev tavuklarında gastrointestinal helmintlerin prevalansını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Dışkı bakısı yapılan 185 tavuk dışkısının 78’inde (%42,16) tek tür, 26’sında (%14,05) iki tür ve 6’sında (%3,25) üç tür olmak üzere toplam 110 (%59,46) adet tavuk dışkı örneği pozitif bulundu. Enfekte tavuk dışkılarından 4’ü nematod ve 2’si cestod olmak üzere 6 tür helmint yumurtası tespit edildi. Helmint ve enfeksiyon türlerine göre oranlarına bakıldığında tek tür ile enfekte olanlar; *Capillaria* spp. 23 (%12,50), *Heterakis gallinarum* 19 (%10,32), *Ascaridia* spp. 18 (%9,78), *Raillietina* spp. 8 (%4,35), *Davania proglottina* 6 (%3,26), *Trichostrongylus tenuis* 4 (%2,17), iki tür ile enfekte olanlar; *Capillaria* spp.+*Heterakis gallinarum* 10 (%5,43), *Capillaria* spp.+ *Ascaridia* spp. 8 (%4,35), *Heterakis gallinarum*+ *Ascaridia* spp. 7 (%3,78), *Raillietina* spp.+ *Davania proglottina* 1 (%0,54), ve üç tür ile enfekte olanlar; *Capillaria* spp.+ *Heterakis gallinarum* + *Davania proglottina* 4 (%2,17), *Capillaria* spp.+ *Heterakis gallinarum*+ *Trichostrongylus tenuis* 2 (%1,09) olarak tespit edildi. Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile Van ili ev tavuklarında helmint enfeksiyonlarının önemli bir oranda bulunduğu tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Gastrointestinal Helmintler, Prevalans, Tavuk, Van.

To cite this article: Denizhan V. Karakuş A. The Prevalence of Gastrointestinal Helminths in Domestically Farmed Chicken in Van, Turkey. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4):443-447.

Submission: 10.10.2019 Accepted: 14.11.2019 Published Online: 24.11.2019

ORCID ID; VD: 0000-0002-0531-9550, AK: 0000-0002-7151-8777

\*Corresponding author e-mail: vetci.sona@hotmail.com

## INTRODUCTION

Poultry farming, especially chicken, has a highly significant place in the food industry in Turkey. The meat and egg products of poultry farming provide for a substantial portion of the animal protein requirements for humans. Particularly, low purchase power of individuals in Turkey results with an insufficiency in animal protein consumption and poultry farming can significantly close this gap since chicken is cheaper and can be processed in various ways (Ünlü 2012).

Parasitic diseases cause significant economic losses in poultry farming. Such diseases are usually subclinical without exhibiting any clinical symptoms and lack of symptoms often lead to a neglect in the diagnosis of parasitic diseases (Anders 1997). Parasitic helminth diseases are quite common especially in chicken and cause significant economic losses in poultry farming industry. The surveys conducted in Turkey reported that the prevalence of helminth in chickens were between 59.13% and 93.44% (Dik et al. 1988, Güçlü 1992, Altınöz 2002).

Helminths can exhibit an extensive prevalence in poultry and can cause low yield and high susceptibility to other diseases. Helminths can even cause chicken to die due to severe infections (Özdal and Ayaz 2005, Orunç and Biçek 2009).

The present study aimed to investigate the presence of helminth infections through feces examination in chicken which were farmed domestically and free-range in İpekyolu, Tuşba and Edremit districts of Van Province in Turkey.

## MATERIAL and METHOD

The present study was conducted through the analysis of feces samples from 185 chicken, farmed in different coops, with a population of 15 to 30 chicken, between April 2017 and June 2018 in İpekyolu, Tuşba and Edremit districts of Van Province in Turkey. Feces samples were taken from at least 3 and at most 5 chicken that were farmed in different coops. The fresh feces samples collected from chicken were placed in the feces containers and

these containers were labeled for the region, date and protocol numbers. Feces samples retrieved from chicken were examined immediately. The samples were first examined macroscopically, then native, flotation and sedimentation methods were applied to these samples. Subsequently, parasitic eggs were determined through microscopic examination at 10X and 40X magnifications. The samples were stored in containers in a refrigerator at +4°C in 10% formaldehyde solution until their examination (Ok et al. 1997, Kaya 2003, Gökçen 2008).

## RESULTS

The present study identified that 110 of the feces samples obtained from 185 chicken were infected with helminth eggs, where 78 chicken (42.16%) were infected with single species, 26 (14.05%) were with two species, and 6 (3.25%) were infected with three species. Six helminth eggs, four nematodes and two cestodes, were detected in infected chicken feces. Those infected with single species were studied based on helminth and infection types and the rates of infection was determined as: *Capillaria* spp. 23 (12.50%), *Heterakis gallinarum* 19 (10.32%), *Ascaridia* spp. 18 (9.78%), *Raillietina* spp. 8 (4.35%), *Davania proglottina* 6 (3.26%), *Trichostrongylus tenuis* 4 (2.17%). The infection determined in feces caused by two species were *Capillaria* spp. + *Heterakis gallinarum* 10 (5.43%), *Capillaria* spp. + *Ascaridia* spp. 8 (4.35%), *Heterakis gallinarum* + *Ascaridia* spp. 7 (3%), and *Raillietina* spp. + *Davania proglottina* 1 (0.54%). Infection determined in feces caused by three species were determined as *Capillaria* spp. + *Heterakis gallinarum* + *Davania proglottina* 4 (2.17%) and *Capillaria* spp. + *Heterakis gallinarum* + *Trichostrongylus tenuis* 2 (1.09%). Table 1 presents the infection rates based on species. Once the prevalence of helminth eggs detected in chicken feces were examined, it was found that *Capillaria* spp. was the most common with 47 samples (42.73%), followed by *Heterakis gallinarum* 42 (38.18%), *Ascaridia* spp. 33 (30%), *Raillietina* spp. 9 (8.18%), *Davania proglottina* 11 (10%), and the least common *Trichostrongylus tenuis* 6 (5.45%). Table 2 presents the prevalence of helminths in domestically farmed chickens.

**Table 1.** Prevalence of single and mixed gastrointestinal helminth infections based on feces sample examination of domestically farmed chickens

Detected helminth species	Infected animals (n:110)	Total (n:185)	(%)	Infected animals (n:110) n / (%)
<i>Capillaria</i> spp.	23	12.5		20.91
<i>Heterakis gallinarum</i>	19	10.32		17.27
<i>Ascaridia</i> spp.	18	9.78		16.36
<i>Trichostrongylus tenuis</i>	4	2.17		3.63
<i>Raillietina</i> spp.	8	4.35		7.27
<i>Davania proglottina</i>	6	3.26		5.45
<i>Capillaria</i> spp.+ <i>H. gallinarum</i>	10	5.43		9.09
<i>Capillaria</i> spp.+ <i>Ascaridia</i> spp.	8	4.35		7.27
<i>H. gallinarum</i> + <i>Ascaridia</i> spp.	7	3.78		6.36
<i>Raillietina</i> spp.+ <i>D. proglottina</i>	1	0.54		0.90
<i>Capillaria</i> spp.+ <i>H. gallinarum</i> + <i>D.proglottina</i>	4	2.17		3.63
<i>Capillaria</i> spp.+ <i>H. gallinarum</i> + <i>T. tenuis</i>	2	1.09		1.81
Total	110	59.46		100

**Table 2.** Prevalence of gastrointestinal helminth based on feces sample examination of domestically farmed chickens

Detected helminth species	Helminth species detected in infected animals (n:110)	Total (n:185)	%	Infected animals (n:110) n / (%)
Nematode	<i>Capillaria</i> spp.	47	25.40	42.73
	<i>Heterakis gallinarum</i>	42	22.70	38.18
	<i>Ascaridia</i> spp.	33	17.84	30.00
	<i>Trichostrongylus tenuis</i>	6	3.24	5.45
Cestod	<i>Davania proglottina</i>	11	5.95	10.00
	<i>Raillietina</i> spp.	9	8.86	8.18

## DISCUSSION

Parasitic diseases are one of the factors that adversely affect poultry farming and cause significant death and yield losses. Parasitic diseases in poultry cannot usually be diagnosed in modern and family establishments since the diseases do not exhibit any clinical symptoms. Given that parasitic diseases are detected in a latter phase in poultry, they cause significant economic losses for poultry farmers. Helminth diseases, which also include parasitic diseases, are quite prevalent in chicken. Several species were determined in studies conducted with the aim to reveal helminth infections in chicken in Turkey and these studies reported that helminth species presented diverse prevalence (Atasever and Gümüşsay 1999, Güçlü 1995, Orunç and Biçek 2009, Dik et al. 1988, Güçlü 1992, Köse et al. 2009, Al-Rubai 1987).

Other studies conducted to determine the prevalence of helminth infections in chicken in different countries indicated that the prevalence was 100% in Ghana, 99.9% in India, 91% in Sudan, 90.78% in Kenya, 89.9% in North Africa, 37% in South Africa, 16% in Iran and 1 to 3.4% in Poland (El-Khawad et al. 1977, Eslam and Anwar 1973, Fagasinski 1992, Irungu et al. 2004, Poulsen et al. 2000, Yodav and Tandon 1991, Hassouni and Belghyti 2006). Helminth infection rate was determined as 59.46% in the present study. This rate was lower than the prevalence determined in Ghana, India, Sudan, Kenya and North Africa and higher than in South Africa, Poland and Iran.

Several studies, focusing on the spread of helminth infections in chicken, were conducted in Turkey. These studies reported that the spread rate of helminth parasites in chicken and the determined species exhibited differences for different regions of Turkey. Furthermore, these studies reported that the

spread of helminth infections in chicken in Turkey was between 16.1 and 86.5% (Yaşarol et al. 1961, Merdivenci 1967, Al-Rubai 1987, Dik et al. 1988, Güçlü 1992, Biçek et al. 2000, Gökçen et al. 2003, Kurt and Açııcı 2003, Orunç and Biçek 2009, Köse et al. 2009, Aydın et al. 2010).

A study conducted in Turkey indicated that the prevalence of helminth infection in Ankara was 86.5% and another study reported that 48.24% of chicken farmed in official businesses, 40.85% in private businesses and 78.82% farmed in villages in Ankara were positive with helminth infections (Tolgay 1967, Al-Rubai 1987). Güçlü (1992) reported that chicken farmed in businesses around Ankara were infected with helminth by 30.76% and the rate of helminth infections in domestically farmed chicken in villages was 96%. Chicken farmed in cages in Konya, Turkey were infected with various species of helminth by 11.85%, whereas those farmed in environments with grid base plates were infected by 40.35% and those in family enterprises were by 60% (Dik et al. 1988).

In Afyonkarahisar province, positive infection was determined for layer hens by 11.5% and chicken farmed in villages were positive by 58%, while no infection was determined in broiler chicken (Köse et al. 2009). Another study that focused on chicken farmed in villages in Hakkâri, reported that the prevalence of helminth infections was 82.14% (Aydın et al. 2010). Biçek et al. (2000) reported that helminth infections in chicken were 79.62% in Van and another study conducted by Orunç and Biçek reported that helminth infections in chicken were 52% in Van (Orunç and Biçek 2009). The present study determined that helminth infection rate in domestically farmed chicken was 59.46% and this result exhibited dissimilarities with other studies, however such discrepancy possibly stems from factors such as differences in farming environments, geographical conditions, hygiene conditions and these factors could be effective in the spread rate of helminth infections in chicken.

A study conducted in Konya, determined seven helminth species, one cestode and six nematodes, however, did not determine any trematode species. The determined helminth species were *Ascaridia galli*, *Trichostrongylus tenuis*, *Subulura brumpti*, *Strongyloides avium*, *Heterakis gallinarum*, *Capillaria* spp. and *Choanotaenia infundibulum* and their infection rate was 30.36% (Dik et al. 1988). Aydın et al. (2010) reported that they identified seven helminth species, one cestode, five nematodes and one trematode, in Hakkari. Orunç and Bicek conducted a study in Van, in 2010 and reported that they identified eight helminth species, two cestodes, five nematodes and one trematode. The present study determined six helminth species, two cestodes and four nematodes,

and did not determine any trematode species. Majority of the conducted studies indicated that nematode and cestode species were prevalent in poultry and trematode infections were considerably rare (Yardibi 2004). The findings of the present study based on helminth species exhibited similarities with other studies conducted in Turkey, especially due to not identifying any trematode species.

Bicek et al. (2000), conducted a study in Van and reported that the most prevalent helminth species in chicken was *Capillaria* spp. (22.22%). Another study conducted by Orunç and Biçek in Van indicated that the species present in chicken were *Capillaria* spp. (30%), *Heterakis gallinarum* (15%), *Ascaridia galli* (13%), *Railletina* spp. (10%), *Davenia proglottina* (8%), *Trichostrongylus tenuis* (4%), *Echinostoma* spp. (2%) and *Dispharynx nasuta* (2%) (Orunç and Biçek 2009). Dik et al. (1988) determined that *A. galli*, *T. tenuis*, *S. brumpti*, *St. avium*, *H. gallinarum*, *Capillaria* spp. and *C. infundibulum* were present in Konya, Turkey. Aydın et al. (2010) conducted a study in Hakkâri and reported that they identified *Syngamus trachea* (2.38%), *Echinostoma* spp. (4.76%), *Ascaridia galli* (7.14%), *Railletina* spp. (10.71%), *Trichostrongylus tenuis* (11.90%), *Heterakis gallinarum* (17.85%) and *Capillaria* spp. (27.38%) species. The present study, conducted in İpekyolu, Tuşba and Edremit districts of Van, determined that *Capillaria* spp. was the most prevalent species by 47 (42.73%), followed by *Heterakis gallinarum* 42 (38.18%), *Ascaridia* spp. 33 (30%), *Railletina* spp. 9 (8.18%), *Davania proglottina* 11 (10%) and *Trichostrongylus tenuis* was the least prevalent species by 6 (5.45%).

As a result, the present study determined significant helminth infections in chicken in Van region in Turkey. It was concluded that helminth infections should be seriously taken into consideration, poultry farmers should be adequately informed, and further researches should be conducted to increase the yield and healthy farming in chickens.

## REFERENCES

- Al-Rubai F.** The spread of Helminth infections in chickens in Ankara and its region. Master Thesis, Ankara University Institute of Health Sciences, Ankara, 1987.
- Altınöz F.** The Spread of Digestive System Helminths in Modern Farm Chickens in and Around Ankara. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2002; 26(3): 320-324.
- Anders P.** Helminths and helminthosis in poultry with special emphasis on *Ascaridia galli* in chickens. PhD Thesis. Danish Centre for Experimental Parasitology and Department of Veterinary Microbiology, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark. 1997.
- Atasever A, Gümüşsay KY.** Pathological findings in secal coccidiosis in chickens. *Turk J Vet Anim Sci.* 1999; 23: 269-273.

- Aydın A, Göz Y, Değer S.** Fauna of Helminth in Chickens Grown in Central Villages of Hakkari According to Their Excrement Inspections. *Journal of Vet Fac of Dicle Univ.* 2010; 1(1): 8-12.
- Biçek K, Gül A, Değer S.** Dışkı Bakılarına Göre Van'ın Edremit İlçesindeki Ev Kümeslerinde Yetiştirilen Tavuklarda Helminth Faunası. *YYÜ Vet Fak Derg.* 2000; 4(1): 269-278.
- Dik B, Güçlü F, Gülbahçe S, Cantoray R.** Konya Yöresi Tavuklarında Nematod ve Cestodların Yayılışı Üzerine Araştırmalar. *Selçuk Ü Vet Fak Derg.* 1988; 4(1): 269-278.
- El-Khawad, El-Badawi, Eisa Am.** Helminths in Chickens in Sudan. *Angew Parasitol.* 1977; 18 (3): 142-145.
- Eslam A and Anwar M.** Frequency of Helminths in Fowls in Iran. *Revve Elev Med Vet Poys Trop.* 1973; 26: 309-312.
- Fagasinski A.** Helminth parasites of domestic galliform birds in Poland. *Acta Parasit Polonica* 1992; 10: 347-367.
- Gökçen A, Sevgili M, Altaş MG.** Şanlıurfa yöresindeki tavuklarda helmintolojik araştırmalar. XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi. SB03-7. 8-12 Eylül 2003, Konya.
- Gökçen A.** Helminthlerde tespit, boyama ve kalıcı preparat yapımı. *T Parazit Der Derg.* 2008; 32(2): 177-181.
- Güçlü F.** Helminth Fauna in chicken, turkey, ducks and geese in Ankara Region. PhD Thesis. Ankara University Institute of Health Sciences, Ankara, 1992.
- Güçlü F.** Helminth infections in chickens. *Journal of the Turkish Veterinary Medical Society.* 1995; 7(1): 19-22.
- Hassouni T, Belghyti D.** Distribution of gastrointestinal helminths in chicken farms in the Gharb Region-Morocco. *Parasitol Re.* 2006; 99: 181-183.
- Irungu LW, Kimani RW, Kisia SM.** Helminth Parasites in the Intestinal Tract to Indigenous Poultry in Parts of Kenya. *JS Afr. Vet. Assoc.* 2004; 75 (1): 58-59.
- Kaya G.** Parazitoloji Temel İlkeler ve Laboratuvar Teknikleri. Hatay: Mustafa Kemal Üniversitesi Basımevi. 2003, 45-54.
- Köse M, Sevimli FK, Kozan EK, Çiçek HS.** Prevalence of Gastrointestinal Helminths in Chickens in Afyonkarahisar District, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak.* 2009; 15(3): 441-416.
- Kurt M, Açıcı M.** Samsun yöresi tavuklarda helmint enfeksiyonlarının yayılışı. XVIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi. PB: 089. 8-12 Eylül 2003, Konya.
- Merdıvenci A.** Türkiye'nin Marmara bölgesinde Evcil tavuk, hindi, ördek ve kazlarda görülen trematod, cestod ve nematodlara dair araştırmalar. İstanbul: İst. Üniv. Tıp Fak. Yay. No: 31. 1967.
- Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E.** Dışkı İnceleme Yöntemleri. Özcel M, Altıntaş N. (Eds). *Parazit Hastalıklarında Tanı.* İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi. 1997; 1-148.
- Oruç Ö, Biçek K.** Van Yöresi Tavuklarında Paraziter Fauna Tespiti. *T Parazit Derg.* 2009; 33 (2): 162-164.
- Özdal N, Ayaz E.** Van'da bir tavuk otopsisinde gördüğümüz helmintler. *YYÜ Vet Fak Derg.* 2005; 16(2): 7-10.
- Poulsen J, Permin A, Hinds O, Yelifari L, Nansen P.** Prevalence and Distribution of Gastro-Intestinal Helminths and Haemoparasites in Young Scavenging Chickens in Upper Eastern Region of Ghana. West Africa. *Prev Vet Med.* 2000; 45(3-4): 237-245.
- Tolgay N.** Ankara ve civarı tavuklarında tesadüf edilen bağırsak nematodları üzerine sistematik araştırmalar. AÜ Vet Fak. Yayınları, 1967; 89.
- Ünlü H.** Helminth Fauna in Chickens that is Kept in Rural Areas in Aydın. PhD Thesis. Adnan Menderes University Institute Of Health Sciences. Aydın, 2012.
- Yardıbi ME.** Investigation of digestive system helminths in turkeys PhD Thesis. Ankara University Institute of Health Sciences, Ankara, 2004.
- Yaşarol Ş, Ulaş H, Atılğan T.** Ege'de zoosaniter durum. *Bornova Vet Arşt Enst Derg.* 1961; 2: 4-14.
- Yodav AK, Tandon V.** Helminth Parasitism of Domestic Fowl (*Gallus domesticus* L.) in a Suptropical High-Rainfall Area of India. *Beitr Trop Landwirtsch Veterinarmed.* 1991; 29 (1): 97-104.

## An Assessment of Compliance with The European and National Minimum Requirements on Calf Welfare of Dairy Cattle Farms in İzmir Province

Zehra BOZKURT<sup>1\*</sup>, Mustafa MUTLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Husbandry, 03200, Afyonkarahisar

<sup>2</sup>Ministry of Agriculture and Forestry, Bayındır Agriculture District Directorate, Bayındır, İzmir

### ABSTRACT

The aim of this study was to assess the compliance of dairy cattle farms in İzmir with the minimum requirements for calf welfare. The research was carried out in 30 dairy cattle farms in Bayındır district of İzmir province. A measurement, observation and evaluation form was used that developed based on the minimum calf welfare requirements defined in the European Union (2008/119/EC) and national animal welfare legislation. Observations, determinations and measurements were made in the dairy cattle farms that accepted to participate in this research, and resource and management based welfare assessments were performed in calf barns. According to the findings, the physical conditions for feeding and housing of calves were favourable; however, cleanliness of barns and equipments and use of bedding were poor. As a result, it was determined that minimum requirements for calf welfare in dairy cattle farms in Bayındır district in İzmir province were met in terms of feeding, health care and daily inspection, but there were significant shortcomings related to good housing. To raise awareness of animal welfare and increasing the level of education of farmers on the concept and legislation of animal welfare has been proposed in order to increase dairy farms' compliance with calf welfare requirements.

**Keywords:** İzmir Province, Dairy Cattle Farms, Welfare standards, Calf Welfare

\*\*\*

### İzmir İlindeki Süt Sığırı İşletmelerinin Buzağı Refahı Bakımından Avrupa Birliği ve Ulusal Minimum Gerekliliklere Uyumunun Değerlendirilmesi

### ÖZ

Bu araştırmanın amacı, İzmir ilinde bulunan süt sığırı işletmelerinin minimum buzağı refahı gerekliliklerine uyumunun değerlendirilmesidir. Araştırma, İzmir iline bağlı Bayındır ilçesinde toplam 30 süt sığırı işletmesinde yürütülmüştür. Avrupa Birliği (2008/119/EC) ve ulusal mevzuatta tanımlanan asgari buzağı refahı gerekliliklerine dayanılarak geliştirilen bir ölçme, gözlem ve değerlendirme formu kullanılmıştır. Araştırmaya katılmayı kabul eden çiftliklerde gözlem, tespit ve ölçümler yapılarak buzağı barınaklarında kaynak ve idare ile ilgili refah değerlendirmeleri yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, buzağuların beslenme ve barınmasına ilişkin fiziki koşulların uygun olduğu ancak barınak ve ekipman temizliği ile altlık kullanımının yetersiz olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, İzmir'in Bayındır ilçesinde süt sığırı işletmelerinde buzağı refahı yönünden minimum gerekliliklerin besleme, sağlık idaresi ve günlük kontroller açısından karşılandığı, ancak barındırma ile ilgili önemli eksikliklerin bulunduğu belirlenmiştir. Süt sığırı işletmelerinin buzağı refahı minimum gerekliliklerine uyumunun artırılması için çiftçilerin hayvan refahı kavramı ve mevzuatı konusunda farkındalığının ve eğitim düzeyinin artırılması önerilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** İzmir İli, Süt Sığırı İşletmeleri, Refah Standartları, Buzağı Refahı

To cite this article: Bozkurt Z, Mutlu M. An Assessment of Compliance with The European and National Minimum Requirements on Calf Welfare of Dairy Cattle Farms in İzmir Province. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4):448-455.

Submission: 10.10.2019 Accepted: 11.11.2019 Published Online: 28.11.2019

ORCID ID; ZB: 0000-0001-8272-7817, MM: 0000-0002-5933-9012

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

## INTRODUCTION

It is expected that worldwide demand for animal products such as meat and milk will increase in the coming years (Berckmans 2014). In order to correspond to the increase in food demand, intensive animal production techniques and feed technologies are used in farms and, the management of dairy cattle herds includes more and more automation (Smil 2002, Miller et al. 2010, Berckmans 2014).

With the pressure of high genetic selection, high-yielding cows were subjected to stressful intensive farm conditions. So, they have been managed with herd management strategies and mass production approaches (Webster, 2019). These production strategies also affect to calves (Beam et al. 2009). Recently, increasing consumer concern about animal welfare, food quality and safety and environmental protection led to a revision of intensive animal production strategies (Blokhuys et al. 2003, Webster 2019). World Animal Health Organization was announced that, if animals are healthy and relaxed, feed well, exhibit their innate behaviours, and if they do not suffer from pain, fear or discomfort, their well-being is good (OIE 2012). These are related to three dimensions of animal welfare concept such as; animal's normal biological functions work without difficulty (healthy, feed well, etc.), animal's emotional state is positive (absence of negative emotions such as pain and chronic fear), and animals can exhibit certain normal behaviours (Blokhuys et al. 2003, Berckmans 2014, Webster 2019).

The EU published the White Paper and carried out fundamental reforms in the area of food safety and quality in the year 2000. This reforms of the Union include an effective consumer policy with an update of current legislation, strengthened management and traceability in food production (Blanchard 2004). Thus, the “farm-to-fork” food safety approach was implemented aiming to take of public health and animal health at the center of EU food policy instead of a production-oriented approach (EFSA 2015). The European Union Animal Welfare Strategy 2012-2015 purposes to simplify the animal welfare regulations in the Union and to strengthen the competitiveness of agriculture by increasing the synergy in the Common Agricultural Policy (Main et al. 2014). In order to increase the competitiveness of the member countries in the global food market, European Union's food chain policy is focused on the links between animal welfare, animal health and food safety. Turkey will also comply with these European policies as a candidate country for accession to EU.

Turkey's accession negotiations for full membership to EU were started in 2005 and within the scope of the *acquis* studies (for 12. Food Safety, Veterinary and Phytosanitary Policy chapter), the Implementing

Regulation on Minimum Standards for the Protection of Calves entered into force 22 November of 2014 (Official Gazette No: 29183) and it has defined the legal minimum requirements for protection of calves on the dairy cattle farms in Turkey (comply with 2008/119/EC). According to this legislation, animal welfare inspections have to be carried out in dairy cattle farms annually (EU 2009, Anonymous 2014). Therefore, the compliance of dairy cattle farms with EU and National welfare legislation is significant to improve the competitiveness of Turkey's milk sector in Union (Anonymous 2018).

This study was conducted to assess the compliance of dairy cattle farms with minimum legal requirements for calf welfare in Izmir that is the second largest cow milk producer province in Turkey.

## MATERIAL and METHOD

### Development of the measurement, observation and evaluation form

The study was performed in a total 30 dairy cattle farms consisting of small (1-50 cows), medium (51-100 cows) and large (101 cows and more) sized farms in 8 central villages in Bayındır district of İzmir province during May and June in 2018. The dairy cattle farms were randomly selected with the stratified and cluster sampling methods. After interviewed with the farm owners and explained our research to them the farms were visited that agreed to participate in the research (same numbers of farms from each farm size group were surveyed).

A measurement, observation and evaluation form has been developed for use in this study. This form was depended on the minimum calf welfare requirements defined by the EU (Directive 2008/119/EU) and national legislation (Regulation on Minimum Standards for the Protection of Calves) (EU 2009, Anonymous 2014). In addition that, Welfare Quality® protocol which have been developed to assessment of calf welfare were used (Welfare Quality 2009). The form consisted of two sections. The first section was included the qualitative and quantitative observations and measurements on calf rearing to be used for resource-based assessments of calf welfare (properties of barns or pens, equipments, feed and water resources, air conditioning, ventilation, lighting). In order to be used for management-based assessments of calf welfare, the second section was covered the calf rearing practices and the farm data were obtained from the farmers by face to face interviews or farm data were received from farms where records were kept regularly (painful or aversive treatments, calf feeding with colostrum or milk, bedding, calf rearing management, ect). All measurements, observations and evaluations and face-to-face interviews within each farm were made



by the same person and completed within the same day.

The following observations, evaluations and measurements were carried out to assess the accommodation comfort and easy movement possibility of animals in the barns; pen types (individual or group), numbers of pens and total floor areas of each pens, usage harmful materials to calves in the construction of calf barns (present or not present), presence of appropriate insulation, heating and ventilation devices, ventilation type (natural, mechanical, natural supporting mechanical system are mixed), presence appropriate natural or artificial lighting equipment (present or not present), calf housing density in group pens ( floor area per calf), floor slipperiness and cleanliness of barns and providing of appropriate bedding in the calf in rest areas (present, present but insufficient, not present sufficiently).

In terms of good health principle, the questions were asked to the farmers; whether the sick calves were isolated in adequate accommodation with dry, comfortable bedding, frequency of inspection of calves' health and well-being in a day, provision of veterinary care for all sick calves, the number of dead calves (losses) in last 12 months and the surgical procedures or modifications in calves (castration, procedures for tail docking and disbudding or dehorning).

The observations and examinations to evaluate of calf welfare in line to good feeding principle were the types of calf feeders and water points (individual or group) or feeding systems (manual or automatic), cleanliness and functioning of feeding devices, the way of calf feeding with colostrum, milk or replacers (bottle or mother sucking), the possibility of reach to food of all calves at the same time when using automatic feeding systems in group barns and adequate composition of replacers especially for iron and fibrous food. Farmers were asked whether colostrum was given to calves in the first 6 hours after birth, duration of each colostrum meal, daily milk feeding frequency, management of milk feeding program up to weaning, weaning age and weaning method. It was observed whether there was generator in the farm and whether the mechanical and automatic equipment is combined with an alarm. The alternative feeding and ventilation methods and frequency of control of the automatic equipment were learned from the farmers. Tethered calves in the visited farms were counted.

The statistical analysis was performed using SPSS 18.01 for Windows and Microsoft Excel 2007 programs. The descriptive statistics (percentages, means and standard error of mean) were used in the analysis of the data to determine the present situation in terms of

compliance with the minimum calf welfare requirements on dairy farms.

## RESULTS

The results on the resource-based and management-based animal welfare assessments for dairy calf welfare related to housing and automatic equipment management in the farms are shown in Table 1. Most of pens that were observed in the farms (63.33%) were group pens. It was determined that 80.00% of the dairy farms did not use any materials that could be harmful to the well-being and health of calves in the construction of calf barns. The bedding was favourable in calf resting areas in 3.40% of the farms. However, calf pen's floor were not slippery in 96.70% of the farms. Only 40.00% of the farms had clean calf pens and disinfection frequency was sufficient in this areas. Insulation, heating and ventilation of animal barns were suitable in 73.30% and installation of electrical circuits and equipment was appropriate all of the farms and there were lighting equipments to provide adequate natural and/or artificial light in 73.30% of farms. In the visited dairy farms, the average number of individual and group pens were of 6.73 and 2.75 and total floor area of those pens were 3.96 and 32.22 m<sup>2</sup> respectively. The mean housing density was found as 4.33 m<sup>2</sup>/calf in group pens (Table 1).

In 3.30% of the farms automatic feeding and ventilation systems and spare equipments were used, the automatic systems were combined with alarm and checked at least once a day. In all visited farms, it was observed that electrical equipment was placed in a way that would not give electric shocks to calves, but the ratio of farms with generator was only 10.00%(Table 1).

The results on the resource-based and management-based animal welfare assessment for dairy calves related to feeding, weaning, tethering and health care in dairy cattle farms are presents in Table 2. The ratios of the farms where individual feeders, group feeders and both of two type feeders have been detected as 3.30, 63.30 and 33.40% respectively. The cleanliness of the feeding systems was insufficient in 36.70% of the farms. It was observed that the calves were able to take colostrum in the first 6 hours immediately after birth and that colostrum was given to calf by bottle in 96.67% of the farms. Milk or milk replacers were given to the calves with manual (93.37%) or automatic (3.33%) up to weaning age. It was reported that calves were fed twice a day with raw cow milk (83.30% of farms) or milk replacers (16.70% of farms). There were no regular monitoring or data recording with regard to duration of each colostrum feeding session (Table 2).

All calves were provided access to food at same time in the farms where automatic feeding was applied and calves are housed in groups. Approximately half of dairy farms (56.70%) consider the age of the calf as a criterion for weaning and other half take into account the weight of the calf or the amount of concentrate feed consumed daily. The average age of weaning was calculated as 85.33 days by using the the owners' notifications. Tethered calves were found in 30.00% of the farms (Table 2).

In the last 12 months, the average number of calves born on dairy farms was calculated as 29.90. The ratio of the dairy farms that provide adequate accommodation with dry, clean and comfortable bedding for sick calves was only 12.90% however, all

farmers reported that they provides veterinary care when calves get sick and they inspects calves for their health and well-being twice a day. Male calves were vaccinated for pox and mouth disease (FMD), female calves were vaccinated for pox, mouth disease (FMD) and brucellosis, and all calves were identified within 20 days of birth by ear tag. Depending on farmers' reports, the avarage calf mortality was 11.44% in the last 12 months and only 20.00% of farms there were no calf losses.As the farmers's declerations, tail docking or castration were not applied but disbudding was performed to calves (90.00%) without anesthesia in 86.67% of the farms (Table 2).

**Table 1.** The results of assessment of housing and automatic equipment management in terms of their impacts on calf welfare in dairy cow farms.

Welfare Principles	Legal minimum requirements for protection of calves	Results
<b>Housing</b>	Calf barn types	Individual pens (6.67%), group pens (63.33%), individual and group calf pens mixed (30.00%)
	Harmful effects of barn materials	Present (20.00%), not present (80.00%)
	Floor slipperiness	Slippery (3.30%), not slippery )96.70%)
	Calf bedding	Not present (73.30%), present but insufficient (23.30%), present suffeciently(3.40%)
	Disinfection frequency of equipments and cleanliness of barns and pens	Sufficient (40.00%), insufficient (60.00%)
	Insulation, heating and ventilation	Suitable (73.30%), not suitable(26.70%)
	Ventilation type	Natural (83.30%), mechanical (3.30%), natural+ mechanical (13.40%)
	Natural or artificial lighting	Present (73.30%) not present (26.70%)
	Installation of electrical equipment	Does'nt give electric shocks to calves (100.00%)
	Individual pens	Number of individual pens 6.73±1.74
		Pen lenght (m) 2.31±0.32
		Pen width (m) 1.57±0.12
		Total floor area of pen(m <sup>2</sup> ) 3.96±0.33
		Confinement time in individual pens (days) 86.11± 2.97
Group pens	Number of group pens 2.75±0.29	
	Number of calves keep in group pens 7.14±0.59	
	Total floor area of grup pen(m <sup>2</sup> ) 32.22±3.33	
	Living area per calf in group pens (m <sup>2</sup> /calf) 4.33±0.21	
	Number of tethered calves 3.78±1.06	
<b>Automatic equipment management</b>	Alarm for mechanical equipment	Present (3.30%), not present (96.7%)
	Daily control for automatic systems	Once a day (100.00%)
	Alternatives for automatic systems	Present (3.30%) not present (96.70%)
	Province of generator	Present (10.00%) not present (90.00%)

**Table 2.** The results of assessment of feeding, weaning, tethering and health care in terms of their impacts on calf welfare in dairy cow farms.

Welfare Principles	Legal minimum requirements for protection of calves	Results
<b>Feeding</b>	Feeding systems	Manuel (96.70%), automatic (3.30%)
	Access to the food at same time in group housing	Provided for all calves are housed in groups.
	Types of feeders and water points	Individual (3.30%), group (63.30%), both of them mixed (33.40%)
	Cleanliness and functioning of feedings system	Suitable (63.30%), not suitable (36.70%)
	Colostrum feeding immediately after birth	Within the first 6 hours the latest (100.00%)
	Duration of each colostrum feeding session	There were no regular monitoring
	The way of colostrum feeding	Bottle suckling (96.67%), cow suckling (3.33%)
	Suckling methods	Manuel (bottles) (93.37%), automatic (multi-nipples pails ) (3.33%)
	Calf feeding between 3-days to weaning	Raw cow milk (83.30%), milk replacers (16.70%)
	Feeding or suckling frequency	Twice a day (100.00%)
	Calf feed formulation (iron, forage, etc)	Appropriate (100.00%)
<b>Weaning</b>	Weaning criteria	Calf age (56.70%), live weight of calf (20.00%) amount of feed intake(23.30%)
	Weaning age (days)	85.33±1.83
<b>Tethering</b>	Ratio of farms with tethered calves	Present (30.00%), not present (70.00%)
<b>Health care</b>	Adequate accommodation for sick calves	Present (12.90%), not present (87.10%)
	Veterinary care	Yes (100,00%)
	Daily inspection frequency of the calves	Twice a day (100.00%)
	Vaccination for male calves	Pox, foot and mouth disease (FMD)
	Vaccination for female calves	Pox, foot and mouth disease (FMD), brucellosis
	Age of identification (days)	20.00±0.00
	In last 12 months	Number of calves was born 29.90±5.00
		Number of lossed calf 4.27 ±1.79
		The calf mortality (%) 11.44 ±2.05
		Disbudding Yes (90.00%), no (10.00%)
	Disbudding methods Chemical (6.67%), surgical(50.00%), hot-iron( 33.33% )	
	Calf age for disbudding(days) 4.83±0.83	
	Anesthesia for disbudding Yes (3.33%), no (86.67%)	

## DISCUSSION and CONCLUSION

According to the results of this survey was conducted in dairy farms in Bayındır district of İzmir province, the materials and devices used in the construction of calf barns and pens were not harmful to calves and the properties with insulation, heating and ventilation of the calf barns were appropriate. The pen floors in the calf barns were flat, smooth and not slippery,

which were favorable for avoiding falling of the calves (FAWC 2019b). In the majority of the visited farms, frequency of equipment disinfection and cleaning of floors in the calf barns were insufficient, and the resting areas with plenty of bedding material were low (only 3.40% of the farms). But, bedding and cleaning in the calf barns and pens are critical to ensure well-being of the calf (EU 2009, Anonymous 2014, DEFRA 2000) and, this housing

areas should be cleaned frequently and, feces or other contaminants should be removed frequently to minimize the odors and prevent the barns from attracting flies or rodents (Vasseur et al. 2010, Webster 2019). Especially in small and medium-sized dairy farms, bedding useage was not common and the ratio calf barns with dirty calf pens increased as the size of the enterprise increased. These results were evaluated as a risk for the health and welfare of calves. Thus, it is remarkable that the on-farm calf mortality were high (11.44%). According to Ninomiya and Sato (2009), floor dirtiness and the small amount of bedding materials in calf pens causes to increase of calf's standing behavior which retain the calf from resting and increases the calf's stress, pain, and suffering. Supporting to this reserach findings, Camiloti et al. (2012) concluded that dairy calves prefer to dry bedding and showed reluctance to lying on concrete floors and, then they argued that to access soft and dry bedding of growing calves is significant.

Another minimum welfare requirement for calves is that the calves should be able to perform their natural behaviors as much as possible and accommodated in an environments with minimal restriction (EU 2009, Anonymous 2014). In 6.67% of dairy farms, calves were housed only in individual pens majority of which were constructed using wood and metal. As legal minimum requirements for calf welfare, the width of any individual calf pens should be at least equal to the height of the calf at the withers, measured in the standing position, and the pen length should be at least equal to the body length of the calf (EU 2009, Anonymous 2014). Accordingly, width and lenght of the calf pens and barns were measured. Our finding on average individual pen width was 157 cm and this value were higher than the average cidago height (73-86 cm between birth and 8 weeks of age) reported by Doğan (2014) for Holstein calves. It has been argued that the measured length (231 cm) of the individual calf pens is also compatible with the minimum requirements because this value is longer than 1.1 times of the average Holstein calf body length (72-96 cm for 8-weeks old calves) (Doğan 2014). These results suggest that individual calf pens provide sufficient space for movement or grooming for calves, in line with the findings of Le Neindre (1993). The size of the dairy farm increased, the number of individual calf pen on the farm increased, but the average area of these individual calf pens decreased. Moreover, the average duration of confinement of calves in individual pens was calculated as 86.11 days in this research and, it was not compiable with the minimum requirement that calves cannot be kept in individual pens after 8 weeks of age. The ratios of the farms that the calves were housed in group pens and, both types of housing were determinated were 63.33% and 30.00%. The living area per animal was calculated as 4.33 m<sup>2</sup> in the

group pens and this value complies with the minimum requirements. This results showed that group calf pens provide the animals with wide space to move around and exercise. According to the minimum requirements for the protection of calves, the space allowance available to each calf should be at least equal to 1.5 -1.8 m<sup>2</sup> for each calves kept in group pens (EU 2009, Anonymous 2014). Group housing is reported to be more favorable for calf welfare for the reason it could provide social contact with other animals, play and exercise opportunities (Hänninen et al. 2005). But, there are conflicting reports of the impact of group housing on health, growth, or yields in calves (Le Neindre 1993, Hänninen et al. 2005, Doğan 2014).

Considering the legal minimum requirements for good feeding principle, it can be said that dairy farms in İzmir were generally compatible. All calves were fed at least twice a day with an appropriate diet (fibrous food, iron, etc.) adapted to their age, weight and behavioural and physiological needs and calves could access to the food at the same time when they kept in group pens with an automatic feeding system (EU 2009, Anonymous 2014, FAWC 2019b).

The calves were receiving their first colostrum meal within 6 hours immediately after birth and then they were fed with milk for 3 days. Feeding with milk and colostrum was carried out with bottle or bottle buckets and, it was thought that this may provide an opportunity for good human-animal interactions. These results show that the farms meet minimum welfare requirements for early calf feeding. It is especially important for calves to get enough colostrum in order to gain adequate immunity and to protected from diseases (EU 2009, Anonymous 2014). But, in one-third of the dairy farms (36.70% of farms) cleanliness and functioning of the feeding systems were insufficient, and this was a risk that could adversely affect calves' access to food as well as to calf health and welfare.

Farmers' preference for weaning criteria was calf age however this may adversely affect calves (Vasseur et al. 2010). Starting to take solid foods before rumen development of calves consuming milk or liquid foods can pose risk to their health and well-being (Baldwin et al. 2004). So, Greenwood et al. (1997) reported that male and female calves should reach daily concentrate feed which is sufficient for weaning on different days. For avoid a stressful weaning and the absence of calf losses after weaning, a smooth transition from liquid food to solid food should be provided and calves should be weaned based on concentrate feed consumption (Loberg et al. 2008). Supporting to this reports, Le Neindre (1993) stated that milk-only diets should be avoided, and it is necessary to provide calves with adequate roughage.

The minimum criteria that dairy farms should comply in terms of good health principle were evaluated in the study. The all farmers declared that they inspect all housed calves at least twice a day, provides veterinary care and treatment to sick animals and vaccinate all calves regularly (DEFRA 2000, EU 2009, Anonymous 2014). Otherwise, there was no artificial lighting in calf barns in one quarter of farms and 90.00% of the farms did not have generator. It was evaluated that these farms could not comply to the minimum requirement related to at least 8 hours lighting per day (EU 2009, Anonymous 2014) in order to meet the behavioral and physiological needs of calves (Kiley-Worthington 1983, DEFRA 2000).

Neither castration nor tail docking were performed in the farms, but calves were disbudded in 90.00% of the farms and this painful procedure were applied to calves without adequate anaesthesia in 86.67% of farms. Horn is an significant welfare problem in the management of dairy cattle herd (Winder et al. 2016), therefore, disbudding is widely accepted (Gottardo et al. 2011). But, according minimum requirements for calf welfare the painful procedures like as disbudding can only be performed under conditions that cause minimal stress, pain and suffering (Anonymous 2014). Anesthesia should be used in this procedures, and should be given by the veterinarian ( FAWC 2019b, Vasseur et al. 2010). On the other hand, Winder et al. (2016) mentioned that the use of appropriate pain-control procedures in this surgical procedures also positively influenced the consumer's view for the dairy industry. Disbudding can be carried out by cautery or application of a chemical paste but all procedures cause definite stress responses and calves suffer even if anesthesia is used (Stafford and Mellor 2011). The recommended age for disbudding is differs in a range from first week to 2 months of age ( Alsaod et al. 2014, FAWC 2019a). The average disbudding age was 4.83 days in this study, and early disbudding of calves may have reduced the negative effect of the absence of anesthesia. So, age is as important factor for anesthesia usage for the reason horn bud is free-floating in the skin until about 2 months of age (Gottardo et al. 2011, Alsaod et al. 2014, FAWC 2019a). One of the positive welfare findings in the study was the absence of calf mouthpieces.

It is concluded that, dairy cattle farms in the Bayındır district of İzmir province have appropriate welfare conditions in terms of calf feeding, health care and daily inspection to meet the minimum requirements of calves designated in EU and National legislation. Although adequate indoor living space was provided for calves, there were some gaps for compliance of the farms with legal requirements for dairy calf welfare. The main gaps were to keeping of calves in individual pens for a long time, the shortcomings related to cleanliness, disinfection and bedding usage

in barns and, to tying the calves widely. To raise awareness of animal welfare and, training of farmers on concept and legislation of animal welfare has been suggested as a strategic approach in order to increase dairy farms' compliance with calf welfare requirements.

## REFERENCES

- Alsaod M, Doherr MG, Greber D, Steiner A.** Experience with the delegation of anaesthesia for disbudding and castration to trained and certified livestock owners. *BMC Veterinary Research*. 2014; 10(1): 35.
- Anonymous.** Buzağuların Korunması ile İlgili Asgari Standartlara İlişkin Yönetmelik. (Official Gazette Date: 22 November 2014, No: 29183).
- Anonymous.** Süt Sektör Politika Belgesi 2018-2022. Tagem Ar-Ge & İnnovasyon. 2018; Ankara.
- Baldwin RLVI, McLeod KR, Klotz JL, Heitmann RN.** Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. *J. Dairy Sci.* 2004; 87:E55–E65.
- Beam AL, Lombard JE, Kopral CA, Garber LP, Winter AL, Hicks JA, Schlater JL.** Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. *Journal of Dairy Science.* 2009; 92(8):3973-3980.
- Berckmans D.** Precision livestock farming technologies for welfare management in intensive livestock systems. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties.* 2014; 33(1):189-196.
- Blanchard O.** The economic future of Europe. *Journal of Economic Perspectives.* 2004; 18(4):3-26.
- Blokhuis HJ, Jones RB, Geers R, Miele M, Veissier I.** Measuring and monitoring animal welfare: transparency in the food product quality chain. *Animal Welfare-Potters Bar Then Wheathampstead.* 2003; 12(4):445-456.
- Camiloti TV, Fregonesi JA, Von Keyserlingk MAG, Weary DM.** Effects of bedding quality on the lying behavior of dairy calves. *Journal of Dairy Science.* 2012; 95(6):3380-3383.
- DEFRA.** Guidance for Caring for beef cattle and dairy cows. 2000; UK., (Available at <https://www.gov.uk/government/publications/code-of-recommendations-for-the-welfare-of-livestock-cattle/beef-cattle-and-dairy-cows-welfare-recommendations>; Accession date: 03.09, 2019).
- Doğan Z.** Siyah-alaca buzağularda farklı sütten kesme yaşının büyüme performansı üzerine etkileri. 2014;(Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi).
- EFSA (European Food Safety Authority).** Shaping the future of food safety, together: proceedings of the 2nd EFSA Scientific Conference. Milan, Italy, 14–16 October. *EFSA Journal.* 2015; 13(10):1310-1317.
- EU (European Union)** Directives Council Directive 2008/119/EC of 18 December 2008 laying down minimum standards for the protection of calves. 2018; *Official Journal of the European Union L 10/7,* 15.1.2009.
- FAWC.** Disbudding and dehorning.2019a; Available at: <http://www.fawc.org.uk/reports/dairycow/dcowr069.htm>; Accession date: 11.09, 2019).

- FAWC.** Animal Welfare Guidelines for Dairy Farmer. Farm Animal Welfare Advisory Council. The Department of Agricultural and Food, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 2019b; UK. (Available at: <http://www.fawac.ie/publications/animalwelfareguidelines>, Accessed 23.08, 2019).
- Gottardo F, Nalon E, Contiero B, Normando S, Dalvit P, Cozzi G.** The dehorning of dairy calves: practices and opinions of 639 farmers. *Journal of Dairy Science*. 2011; 94(11):5724-5734.
- Greenwood RH, Morrill JL, Titgemeyer EC.** Using dry feed intake as a percentage of initial body weight as a weaning criterion. *Journal of Dairy Science*. 1997; 80: 2542-2546.
- Hänninen L, De Passillé AM, Rushen J.** The effect of flooring type and social grouping on the rest and growth of dairy calves. *Applied Animal Behaviour Science*. 2005; 91(3-4): 193-204.
- Kiley-Worthington M.** The behavior of confined calves raised for veal: Are these animals distressed?. *International Journal for the Study of Animal Problems*. 1983; 4(3), 198-213.
- Le Neindre P.** Evaluating housing systems for veal calves. *Journal of Animal Science*. 1993; 71(5): 1345-1354.
- Loberg JM, Hernandez CE, Thierfelder T, Jensen MB, Berg C, Lidfors L.** Weaning and separation in two steps—A way to decrease stress in dairy calves suckled by foster cows. *Applied Animal Behaviour Science*. 2008; 111(3-4): 222-234.
- Main DCJ, Mullan S, Atkinson C, Cooper M, Wrathall JHM, Blokhuis HJ.** Best practice framework for animal welfare certification schemes. *Trends in Food Science & Technology*. 2014; 37(2): 127-136.
- Miller CJ, Howden SM, Jones R N.** Preparing Australian Agriculture, Forestry and Fisheries For The Future. In: *Intensive Livestock Industries Adapting Agriculture To Climate Change*, Ed; Stokes C, Howden M, e-book. Csiropublishing, USA.2010; pp. 171-185.
- Ninomiya S, Sato S.** Effects of 'Five freedoms' environmental enrichment on the welfare of calves reared indoors. *Animal Science Journal*. 2009; 80(3):347-351.
- OIE (World Organisation for Animal Health).** Chapter 7.1. Introduction to the recommendations for animal welfare, Article 7.1.4. In *Terrestrial Animal Health Code*, 21st Ed. 2012, OIE, Paris, 305–306. Available [https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-code/access-online/?htmlfile=chapitre\\_aw\\_introduction.htm](https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-code/access-online/?htmlfile=chapitre_aw_introduction.htm); Accession date: 17.9.2019).
- Smil V.** Worldwide transformation of diets, burdens of meat production and opportunities for novel food proteins. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002; 30(3):305-311.
- Stafford KJ, Mellor DJ.** Addressing the pain associated with disbudding and dehorning in cattle. *Applied Animal Behaviour Science*. 2011; 135(3):226-231.
- Vasseur E, Borderas F, Cue RI, Lefebvre D, Pellerin D, Rushen J, Wade KM, Passille AM.** A survey of dairy calf management practices in Canada that affect animal welfare. *Journal of Dairy Science*. 2010; 93(3):1307-1316.
- Webster J.** *Calf husbandry, Health and Welfare*. 1th Ed. CRC Press. UK.2019; pp.37-204.
- Welfare Quality®2009.** *Welfare Quality® assessment protocol for cattle*. Welfare Quality® Consortium, Lelystad, 2009, The Netherlands.
- Winder CB, LeBlanc SJ, Haley DB, Lissemore KD, Godkin MA, Duffield TF.** Practices for the disbudding and dehorning of dairy calves by veterinarians and dairy producers in Ontario. *Canada. Journal of Dairy Science*. 2016; 99(12):10161-10173.

## Factors Affecting Poultry Meat Consumption Status and Consumption Habits of Students From Faculty of Veterinary Medicine

Ahmet Cumhur AKIN<sup>1\*</sup>, Mustafa Bahadır ÇEVİRİMLİ<sup>2</sup>, Burak MAT<sup>2</sup>, Mehmet Saltuk ARIKAN<sup>3</sup>, Mustafa Agah TEKİNDAL<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mehmet Akif Ersoy University, Veterinary Medicine Faculty, Animal Health Economics and Management Department, 15030, Burdur, Turkey

<sup>2</sup>Selçuk University, Veterinary Medicine Faculty, Livestock Economics and Management Department, 42003, Konya, Turkey

<sup>3</sup>Firat University, Veterinary Medicine Faculty, Animal Health Economics and Management Department, 23119, Elazığ, Turkey

<sup>4</sup>Selçuk University, Veterinary Medicine Faculty, Biostatistic Department, 42003, Konya, Turkey

### ABSTRACT

This research was carried out in Burdur, Elazığ and Konya provinces in order to evaluate the factors affecting the poultry meat consumption status and consumption habits of students belonging to different classes of veterinary faculties. The material of the study was obtained from surveys conducted with 242 students in three different faculties during the academic year 2018-2019. The data were analyzed by SPSS. According to the results of the research; It has been determined that 51.7% of the students are under 250 TL of the monthly individual food expenditure. The ratio of animal food expenditures in individual food expenditures of those students to be 100 TL and below is determined as 59.1%. When the monthly poultry meat consumption rates of the students are examined; The rate of those who did not consume was 5.8%, the rate of those consuming less than 500 gr and 31% of those consuming 500-999gr was determined as 37.2%. It was determined that the students who participated in the survey consumed 1.1 kg of poultry meat per month. It was determined that there was no statistically significant relationship between the poultry meat consumption and the city, class level and shelter status of the students. In fact, a statistically significant relationship was found between the gender, income level, monthly budget for food and amount of monthly budget allocated to animal food.

**Keywords:** Poultry Meat, Income, Consumption, Consumer Preference, Veterinary Faculty

\*\*\*

### Veteriner Fakültesi Öğrencilerinin Beyaz Et Tüketimi Üzerine Etki Eden Faktörlerin Değerlendirilmesi

#### ÖZ

Bu araştırma, Burdur, Konya ve Elazığ illerinde yer alan üniversitelerin veteriner fakültelerinde eğitim görmekte olan farklı sınıflardaki öğrencilerin kanatlı eti tüketim düzeylerine etkili olan faktörlerin güncel olarak ortaya konması amacıyla yapılmıştır. Araştırmanın materyalini, 2018-2019 eğitim-öğretim yılı içerisinde üç farklı fakültede toplamda 242 öğrenci ile yapılmış olan anketlerden elde edilen veriler oluşturmaktadır. Elde edilen veriler SPSS programı ile analiz edilmiştir. Araştırma sonucunda; öğrencilerin %51,7'sinin aylık bireysel gıda harcama tutarının 250 TL altında olduğu belirlenmiştir. Yine bu öğrencilerin bireysel gıda harcamaları içerisinde hayvansal gıda harcama tutarlarının 100 TL ve altında olanların oranı ise %59,1 olarak bulunmuştur. Öğrencilerin aylık kanatlı eti tüketim oranları incelendiğinde; hiç tüketmeyenlerin oranı %5,8, 500 gr'dan az tüketenlerin oranı %31 ve 500-999gr arası tüketenlerin oranı ise %37,2 düzeyinde tespit edilmiştir. Anket katılan öğrencilerin aylık ortalama 1,1 kg kanatlı eti tükettikleri belirlenmiştir. Öğrencilerin eğitim gördükleri şehir, sınıf düzeyi ve barınma durumları ile kanatlı eti tüketim miktarı arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı belirlenmiştir. Nitekim, cinsiyet, gelir düzeyi, gıda maddelerine ayrılan aylık bütçe ile hayvansal gıdalara ayrılan aylık bütçe miktarı arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Beyaz et, Gelir, Tüketim, Tüketici Tercihi, Veteriner Fakültesi

To cite this article: Akın A.C. Çevirimli M.B. Mat B. Arıkan M.S. Tekindal M.A. Factors Affecting Poultry Meat Consumption Status and Consumption Habits of Students From Faculty of Veterinary Medicine. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4):456-462.

Submission: 30.10.2019 Accepted: 27.11.2019 Published Online: 01.12.2019

ORCID ID; ACA: 0000-0003-3732-0529, MBC: 0000-0001-5888-242X, BM: 0000-0002-0455-8736,

MSA: 0000-0003-4862-1706, MAT: 0000-0002-4060-7048

\*Corresponding author e-mail: acumhurakin@mehmetakif.edu.tr

## GİRİŞ

Ulusal gıda arzı ile toplumun yeterli ve dengeli beslenmesinde, hayvancılık sektörü önemli görevler üstlenmektedir. Bu bağlamda ülkelerin gelişmişlik düzeylerinin belirlenmesinde dikkate alınan kıstaslardan birisi de kişi başına düşen hayvansal protein tüketim miktarıdır (Akçay ve ark. 2018). Ancak Türkiye’de gıda maddelerine ulaşabildiğimiz başta temel gıdalar olmak üzere birçok üründe yetersiz kalmaktadır. Bu yetersizlik en çokta et ve et ürünlerinde dikkati çekmektedir. OECD ve Türkiye’de kişi başı et tüketim istatistikleri incelendiğinde; OECD ülkelerinde sığır eti 14.62 kg, koyun eti 1.34 kg ve tavuk eti 30.7 kg tüketilirken, Türkiye’de bu miktarlar sırasıyla 8.57 kg, 4.36 kg ve 19.4 kg düzeyinde olduğu görülmektedir (Anonymous 2019). Türkiye’de son dönemde kırmızı et fiyatlarında yaşanan artışlar (Arıkan ve ark. 2019), tüketicilerin yeterli ve dengeli beslenmeleri için gerekli olan kırmızı ete ulaşılabilirliği büyük oranda kısıtlamıştır (Akın ve ark. 2019). Gıda fiyatlarında yaşanan artışlar dar gelirli tüketicilerin düzenli gıda tüketimini olumsuz etkilemekte (Hernandez ve ark. 2011, Eştürk ve Albayrak 2018), ve toplumun beslenme tercihlerinde değişikliklere yol açmaktadır (Sarris 2013, Bazga ve ark. 2014). Türkiye’de hayvancılık alt sektörlerinden, kanatlı sektörünün uyguladığı üretim modeli, insanların hayvansal proteini en sağlıklı ve en kısa sürede temin etmesinde önemli bir görev üstlenmiştir (Kızılaslan ve Nalıncı 2013). Bu nedenle günümüzde kişi başına hayvansal protein tüketiminde önemli gıdaların başında kanatlı eti yer almaktadır. Kırmızı etin ikame ürünü konumunda olan tavuk etinin (Erdoğan ve Çiçek 2017), tüketim miktarını etkileyen çok sayıda faktör vardır. Bunlar bölgesel kalkınma farklılıkları, tüketici gelir düzeyi, sosyoekonomik ve demografik faktörler, mevsimler, gıda güvenliği ve kalitesi, kişisel zevkler ve alışkanlıklar, ürün fiyatı ve insan sağlığı ile ilgili görüşler genellikle tavuk talebini etkileyen ana etkenler olarak görülmektedir (Aral ve ark. 2013). Dünyada kişi başı kanatlı eti tüketim miktarları ülkelerin gelişmişlik düzeyine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (İskender ve ark. 2015). Türkiye’de kanatlı eti, insanların hayvansal protein tüketimlerinde stratejik bir ürün haline gelmiştir. Bu durum kişi başı kanatlı eti tüketim rakamlarına yansımış olsa da gelişmiş ülkelerin hayli gerisinde kalmaktadır. Kişi başı kanatlı eti tüketim miktarı Türkiye’de 1990 yılında 6.8 kg düzeyinden başlayarak 2019 yılında 19.4 kg düzeyine ulaşırken Amerika Birleşik Devletleri için 1990 yılında 35 kg 2019 yılında ise 50.1 kg seviyesinde kanatlı eti tüketimi olduğu görülmektedir (Anonymous 2019).

Günümüz toplumlarının tüketim alışkanlıklarında yaşanan hızlı değişim ile birlikte insanların dengeli ve yeterli beslenmelerinde sıkıntılar yaşanmaktadır. İnsanların çocukluk ve gençlik çağları, sağlıklı yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıklarının kazanıldığı yaşlar

olması sebebi ile özel bir öneme sahiptir (Ayhan ve ark. 2012). Türkiye’de yeterli ve dengeli beslenme sorunlarıyla sık karşılaşan gruplardan birisi de genç kesimdir (Cevger ve ark. 2008), bu bağlamda üniversite gençliği beslenme alışkanlıkları ele alındığında yetersiz ve dengesiz beslenme sorunları açısından risk arz eden gruplardandır (Ayhan ve ark. 2012).

Bu çalışma ile Burdur, Konya ve Elazığ illerinde yer alan üniversitelerin Veteriner Fakültesi’nde eğitim görmekte olan farklı sınıflardaki öğrencilerin kanatlı eti tüketim düzeylerine etkili olan faktörlerin güncel olarak ortaya konması hedeflenmektedir.

## MATERYAL ve METOT

Araştırmanın materyalini Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi (Burdur), Selçuk Üniversitesi (Konya) ve Fırat Üniversitesi (Elazığ) Veteriner Fakültesi öğrencileri arasından tabakalı örneklem yöntemi ile belirlenmiştir (Botev ve Ridder 2017, Shahrokh Esfahani ve Doughert 2014).

$$n_0 = \frac{Nt^2 pq}{d^2 (N - 1) + t^2 pq}$$

Tablo 1’de fakültelerde hedeflenen ve gerçekleşen anket sayıları sunulmuştur.

Araştırma kapsamındaki 3 fakülteden asgari 114 öğrenci ile anket çalışması yapılması hedeflenmiş olup toplamda 242 kişi ile anket çalışması gerçekleştirilmiştir. Uygulanan ankette öğrencilere kaçınıcı sınıfta okudukları, barınma durumları, tüketmiş oldukları hayvansal gıdaları miktar olarak yeterli bulup-bulmadıkları, aylık bireysel gelir, aylık bireysel gıda harcama ve aylık bireysel hayvansal gıda harcama aralıkları ile kanatlı eti tüketim miktarlarına ilişkin sorular yönlendirilmiştir.

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanılmıştır. Değişkenler medyan (IQR) yüzde ve frekans değerleri sunulmuştur. Kategorik veriler Ki Kare testi ile analiz edilmiştir. Beklenen frekansların %20’den küçük olduğu durumlarda bu frekansların analize dâhil edilmesi için “Ki Kare testi Monte Carlo Tahmin Yöntemi” ile değerlendirme yapılmıştır. Kategoriler arasındaki farklılıklar Bonferroni düzeltmeli iki oran testi ile değerlendirilmiştir. Testlerin anlamlılık düzeyi için  $p < 0,05$  ve  $p < 0,01$  değeri kabul edilmiştir. Yapılan bu çalışma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’nun GO 2018/106 sayılı kararı ile etik kurul onayı almıştır.



## BULGULAR

Araştırmaya 158 erkek (%65,3), 84 bayan (%34,7) olmak üzere toplam 242 öğrenci katılmıştır. Bu öğrencilerden 31'i (%12,8) 1.sınıf, 60'ı (%24,8) 2.sınıf, 49'u (%20,2) 3.sınıf, 42'si (%17,4) 4.sınıf ve geriye kalan 60 kişi (%24,8) 5.sınıf'ta eğitim görmektedir. Barınma durumları incelendiğinde %12'si ailesinin yanında, %2,1'i akrabasında, %16,1'i devlet yurdunda, %12'si özel yurttan ve geriye kalan %56,6'lık çoğunluk ise öğrenci evinde kaldıklarını bildirmişlerdir.

Öğrencilerin aylık gelir ortalamaları 970,02 TL, bireysel aylık gıda harcama ortalamaları 305,14 TL, hayvansal gıdalara yaptıkları ortalama harcama miktarı 113,64 TL olarak hesaplanmıştır. Öğrencilerin %5,8'i hiç kanatlı eti tüketmediğini, %31'i 500 gr'dan az, %37,2'si 500-999 gr, %15,7'si 1-2 kg, %10,3'ü ise 2 kg üzerinde aylık tüketiminin olduğunu bildirmiştir. Ortalama kanatlı eti tüketim miktarları aylık 1,1 kg düzeyinde olup, öğrencilerin %60,7'si tükettiği aylık toplam hayvansal gıda miktarını yetersiz olarak değerlendirmektedir.

Araştırma kapsamındaki veteriner fakültesi öğrencilerinin aylık tavuk ve hindi eti (kanatlı eti) tüketimine etkili olabileceği düşünülen faktörlerin değerlendirilmesine ilişkin bulgular Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 2 incelendiğinde öğrencilerin öğrenim görmekte oldukları üniversitenin, sınıf düzeyinin ve barınma durumu ile kanatlı eti tüketim miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Erkeklerin bayanlara göre kanatlı eti tüketim düzeyi daha yüksek olup, cinsiyet ile tüketim düzeyi arasında anlamlı bir ilişki olduğu ( $p<0.05$ ) görülmektedir. Erkek öğrencilerin 1000 gr ve üzeri aylık bireysel kanatlı eti tüketim miktarı oranı %32,3 iken bu oran bayan öğrencilerde %14,3 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3'te öğrencilerin aylık gelir, bireysel aylık gıda harcaması ve bireysel aylık hayvansal gıdalara yaptıkları harcama aralıkları, miktarları ile kanatlı eti tüketim miktarına olan etkileri incelenmiştir.

Öğrencilerin aylık bireysel gelir aralığı, bireysel olarak gıda harcama aralığı ve aylık bireysel hayvansal gıdalara harcama aralıkları ile kanatlı eti tüketim düzeyi arasında anlamlı bir ilişki olduğu ( $p<0.05$ ) belirlenmiştir. Aylık bireysel gelir miktarı arttıkça, bireysel gıda harcama miktarı ve hayvansal gıdalara yapılan harcama düzeylerinin artmakta ve buna bağlı olarak öncelikle kanatlı eti tüketim miktarı artmaktadır. Öğrencilerin aylık 1000 gr ve üzeri kanatlı eti tüketim miktarı, aylık bireysel gelirleri 300 TL altı olan öğrencilerde %8,6 iken bu oran 1500 TL üzerinde %38,8 olarak bulunmuştur. Bireysel aylık gıda harcama aralığı 150 TL altı olan öğrencilerde, 1000 gr ve üzeri kanatlı eti tüketim oranı %11,9 iken bu oran 500 TL üstü olanlarda %48,3 düzeyinde gerçekleşmiştir. Bireysel aylık hayvansal gıda harcamaları 50 TL altı olan öğrencilerin, 1000 gr ve üzeri kanatlı eti tüketim oranı %10 iken 300 TL üstü olanlarda %66,6 olarak bulunmuştur.

Aylık bireysel gıda harcama aralığında gruplar arasında dengeli sayılabilecek bir dağılımın olduğu görülmektedir (Tablo 3). 150 TL altı, 150-199, 200-249, 250-299, 300-499 TL ve 500 TL ve üzeri aylık gıda harcaması yapanların sırasıyla yüzde dağılımları (%); 17,4, 19,8, 14,5, 14,9, 21,5 ve 12,0 olarak tespit edilmiştir.

Aylık bireysel hayvansal gıdalara yapılan harcamalar incelendiğinde düşük harcama gruplarında birikimin olduğu dikkat çekmektedir. Şöyle ki aylık 50 TL altı, 50-99, 100-149, 150-199, 200-299 TL ve 300 TL üzeri harcama yapanların sırasıyla yüzde dağılımları (%); 28,9, 30,2, 19,0, 8,7, 8,3 ve 5,0 düzeyinde bulunmuştur.

**Tablo 1.** Hedeflenen ve uygulanan anketlerin üniversitelere dağılımı

**Table 1.** Distribution of targeted and applied surveys to universities

Üniversite, Şehir	Populasyon (N)	N <sub>h</sub>	Ulaşılan N <sub>h</sub>
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur	515	29	60
Selçuk Üniversitesi, Konya	795	45	93
Fırat Üniversitesi, Elazığ	695	40	89
Toplam	2005	114	242

**Tablo 2.** Kanatlı eti tüketiminde etkili olabilecek faktörlerin değerlendirilmesi**Table 2.** Evaluation of factors that may be effective in the consumption of poultry meat

Faktörler	Aylık Bireysel Kanatlı Eti Tüketim Aralığı						Toplam	$\chi^2$	P	
	Hiç (Sıfır)	500 gr'dan az	500-999 gr	1000-1999 gr	2Kg ve üzeri					
Eğitim Görülen Veteriner Fakültesi	Mehmet Akif Ersoy Üni.	n	4	15	26	10	5	60	8,054	0,432 <sup>+</sup>
		%*	6,7%	25,0%	43,3%	16,7%	8,3%	100,0%		
	Fırat Üni.	n	6	22	35	16	10	89		
		%*	6,7%	24,7%	39,3%	18,0%	11,2%	100,0%		
	Selçuk Üni.	n	4	38	29	12	10	93		
		%*	4,3%	40,9%	31,2%	12,9%	10,8%	100,0%		
Sınıf Düzeyi	1.Sınıf	n	3	13	11	2	2	31	18,65	0,291 <sup>†</sup>
		%*	9,7%	41,9%	35,5%	6,5%	6,5%	100,0%		
	2.Sınıf	n	4	16	21	13	6	60		
		%*	6,7%	26,7%	35,0%	21,7%	10,0%	100,0%		
	3.Sınıf	n	3	17	21	6	2	49		
		%*	6,1%	34,7%	42,9%	12,2%	4,1%	100,0%		
	4.Sınıf	n	1	11	21	5	4	42		
		%*	2,4%	26,2%	50,0%	11,9%	9,5%	100,0%		
	5.Sınıf/İntörn	n	3	18	16	12	11	60		
		%*	5,0%	30,0%	26,7%	20,0%	18,3%	100,0%		
Barınma Durumu	Ailemin Yanında	n	0	8	10	8	3	29	24,753	0,21 <sup>†</sup>
		%*	0,0%	27,6%	34,5%	27,6%	10,3%	100,0%		
	Akraba Yanı	n	0	3	1	1	0	5		
		%*	0,0%	60,0%	20,0%	20,0%	0,0%	100,0%		
	Devlet Yurdu	n	3	11	17	6	2	39		
		%*	7,7%	28,2%	43,6%	15,4%	5,1%	100,0%		
	Özel Yurt	n	2	15	9	3	0	29		
		%*	6,9%	51,7%	31,0%	10,3%	0,0%	100,0%		
Öğrenci Evi	n	8	37	52	20	20	137			
	%*	5,8%	27,0%	38,0%	14,6%	14,6%	100,0%			
	Diğer	n	1	1	1	0	0	3		
		%*	33,3%	33,3%	33,3%	0,0%	0,0%	100,0%		
Cinsiyet	Erkek	n	10 <sub>a,b</sub>	37 <sub>b</sub>	60 <sub>a</sub>	30 <sub>a</sub>	21 <sub>a</sub>	158	15,724	0,004 <sup>+</sup>
		%*	6,3%	23,4%	38,0%	19,0%	13,3%	100,0%		
	Kadın	n	4 <sub>a,b</sub>	38 <sub>b</sub>	30 <sub>a</sub>	8 <sub>a</sub>	4 <sub>a</sub>	84		
		%*	4,8%	45,2%	35,7%	9,5%	4,8%	100,0%		
Hayvansal Gıda Tüketim Düzeyiniz Sızce Yeterli mi?	Evet	n	6 <sub>a</sub>	27 <sub>a</sub>	32 <sub>a</sub>	20 <sub>a</sub>	10 <sub>a</sub>	95	3,783	0,441 <sup>+</sup>
		%*	6,3%	28,4%	33,7%	21,1%	10,5%	100,0%		
	Hayır	n	8 <sub>a</sub>	48 <sub>a</sub>	58 <sub>a</sub>	18 <sub>a</sub>	15 <sub>a</sub>	147		
		%*	5,4%	32,7%	39,5%	12,2%	10,2%	100,0%		

\* Satır yüzdeleri hesaplanmıştır.

† Pearson Exact Ki-Kare Test

+ Continuity Correction Ki-Kare Test

**Tablo 3.** Kanatlı eti tüketiminde etkili olabilecek ekonomik faktörlerin değerlendirilmesi  
**Table 3.** Evaluation of economic factors that may be effective in poultry meat consumption

Faktörler	Aylık Bireysel Kanatlı Eti Tüketim Aralığı						Toplam	$\chi^2$	p	
	Hiç (Sıfır)	500 gr'dan az	500-999 gr	1000-1999 gr	2Kg ve üzeri					
Bireysel aylık gelir aralığı	300 TL Altı	n %*	2 <sub>a,b</sub> 8,7%	13 <sub>b</sub> 56,5%	6 <sub>a</sub> 26,1%	1 <sub>a</sub> 4,3%	1 <sub>a,b</sub> 4,3%	23	34,626	0,021†
	300-499 TL	n %*	2 <sub>a</sub> 4,4%	18 <sub>a</sub> 40,0%	16 <sub>a</sub> 35,6%	4 <sub>a</sub> 8,9%	5 <sub>a</sub> 11,1%	45		
	500-749TL	n %*	5 <sub>a</sub> 8,8%	19 <sub>a</sub> 33,3%	23 <sub>a</sub> 40,4%	10 <sub>a</sub> 17,5%	0 <sub>b</sub> 0,0%	57		
	750-999TL	n %*	0 <sub>a</sub> 0,0%	12 <sub>a,b</sub> 29,3%	13 <sub>a,b</sub> 31,7%	10 <sub>b</sub> 24,4%	6 <sub>b</sub> 14,6%	41		
	1000-1499 TL	n %*	2 <sub>a,b</sub> 4,4%	8 <sub>b</sub> 17,8%	21 <sub>a</sub> 46,7%	7 <sub>a,b</sub> 15,6%	7 <sub>a</sub> 15,6%	45		
	1500 TL ve Üzeri	n %*	3 <sub>a,b</sub> 9,7%	5 <sub>b</sub> 16,1%	11 <sub>a,b</sub> 35,5%	6 <sub>a,b</sub> 19,4%	6 <sub>a</sub> 19,4%	31		
								100,0%		
								100,0%		
Bireysel aylık gıda harcama aralığı	150TL altı	n %*	2 <sub>a,b,c,d</sub> 4,8%	17 <sub>c,d</sub> 40,5%	18 <sub>b,d</sub> 42,9%	2 <sub>a</sub> 4,8%	3 <sub>a,b,c,d</sub> 7,1%	42	46,452	0,001†
	150-199	n %*	3 <sub>a,b</sub> 6,3%	22 <sub>b</sub> 45,8%	15 <sub>a,b</sub> 31,3%	7 <sub>a,b</sub> 14,6%	1 <sub>a</sub> 2,1%	48		
	200-249TL	n %*	4 <sub>a</sub> 11,4%	12 <sub>a,b</sub> 34,3%	17 <sub>a</sub> 48,6%	2 <sub>b,c</sub> 5,7%	0 <sub>c</sub> 0,0%	35		
	250-299TL	n %*	1 <sub>a,b</sub> 2,8%	7 <sub>b</sub> 19,4%	14 <sub>a,b</sub> 38,9%	10 <sub>a</sub> 27,8%	4 <sub>a,b</sub> 11,1%	36		
	300-499 TL	n %*	4 <sub>a,b</sub> 7,7%	14 <sub>b</sub> 26,9%	14 <sub>b</sub> 26,9%	9 <sub>a,b</sub> 17,3%	11 <sub>a</sub> 21,2%	52		
	500TL ve Üzeri	n %*	0 <sub>a,b</sub> 0,0%	3 <sub>b</sub> 10,3%	12 <sub>a,c</sub> 41,4%	8 <sub>a,c</sub> 27,6%	6 <sub>c</sub> 20,7%	29		
								100,0%		
								100,0%		
Bireysel aylık hayvansal gıdalara harcama aralığı	50 TL altı	n %*	10 <sub>a</sub> 14,3%	35 <sub>a</sub> 50,0%	18 <sub>b</sub> 25,7%	2 <sub>c</sub> 2,9%	5 <sub>b,c</sub> 7,1%	70	77,154	0,001+
	50-99TL	n %*	2 <sub>a,b</sub> 2,7%	19 <sub>b</sub> 26,0%	37 <sub>a</sub> 50,7%	10 <sub>a,b</sub> 13,7%	5 <sub>a,b</sub> 6,8%	73		
	100-149 TL	n %*	1 <sub>a</sub> 2,2%	10 <sub>a</sub> 21,7%	22 <sub>a</sub> 47,8%	10 <sub>a</sub> 21,7%	3 <sub>a</sub> 6,5%	46		
	150-199TL	n %*	0 <sub>a</sub> 0,0%	5 <sub>a</sub> 23,8%	6 <sub>a</sub> 28,6%	9 <sub>b</sub> 42,9%	1 <sub>a</sub> 4,8%	21		
	200-299 TL	n %*	0 <sub>a</sub> 0,0%	5 <sub>a</sub> 25,0%	5 <sub>a</sub> 25,0%	4 <sub>a,b</sub> 20,0%	6 <sub>b</sub> 30,0%	20		
	300 TL ve üzeri	n %*	1 <sub>a,b</sub> 8,3%	1 <sub>b</sub> 8,3%	2 <sub>b</sub> 16,7%	3 <sub>a,b</sub> 25,0%	5 <sub>a</sub> 41,7%	12		
								100,0%		
								100,0%		

\* Satır yüzdeleri hesaplanmıştır.

† Pearson Exact Ki-Kare Test

+ Continuity Correction Ki-Kare Test

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Toplumu oluşturan fertlerin yeterli ve dengeli beslenmeleri için gerek devletlere gerekse ailelere büyük görevler düşmektedir. Bu bağlamda en büyük risk grubu olan çocuklara ve gençlere büyüme süreçlerinde gereken desteğin verilmesi ve doğru beslenme eğilimlerinin kazandırılması gerekmektedir. Bu kapsamda Türkiye'de genç nüfusun beslenme alışkanlıkları ve davranışlarının düzenli takip edilerek zamanında ve uygulanabilir politikaların oluşturulması gelecek nesillerin yetiştirilmesinde önem arz etmektedir.

Araştırmanın bulguları konu ile benzer çalışmalar itibarıyla değerlendirildiğinde, Cevger ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada öğrencilerin aylık bireysel beyaz et tüketimi türlere göre 1 kg ve üzerinde olan öğrencilerin oranı, tavuk etinde %60,6 hindi ile diğer kanatlı etlerinde %2,4 olarak tespit edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada öğrencilerden %58,8'nin aylık 1 kg ve üzerinde beyaz et tükettikleri bildirilmiştir (Sarıözkan ve ark. 2007). Elazığ'da yapılan bir başka çalışmada ise veteriner fakültesi öğrencilerinin

%21,9'u aylık 1 kg üzeri kanatlı eti tükettikleri belirtilmiştir (Gökhan 2013). Araştırma kapsamında 1 kg ve üzerinde kanatlı eti tüketen öğrencilerin %26 oranında olup diğer çalışmaların çoğuna kıyasla düşük bulunmuştur.

Artvin'de üniversite öğrencilerine yönelik gerçekleştirilen başka bir çalışmada katılımcıların haftalık tavuk eti tüketimi 1,3 kg düzeyinde bildirilmiştir (İskender ve ark. 2015). Samsun ilinde veteriner fakültesi öğrencileri ile yapılan diğer bir çalışmada ise öğrencilerin aylık kanatlı eti tüketim miktarı 987 g düzeyinde bulunmuştur (Şentürk 2011). Araştırma kapsamında öğrencilerin aylık kanatlı et tüketim miktarı 1,1 kg düzeyinde olup veteriner fakültesinde gerçekleşen çalışma ile benzer bulunmuştur.

Araştırma bulgularında tavuk eti tüketim miktarına etkili olabilecek faktörler değerlendirildiğinde; eğitim görülen şehrin, fakültenin, sınıf düzeyinin, barınma durumunun etkili olmadığı görülmektedir (Tablo 1). Bununla kısmen ilişkili bir çalışmada ise gelir grupları arasında yerleşim yerinin gıda talepleri üzerine etkili

## TEŞEKKÜR

2. Uluslararası Sağlık Bilimleri ve Yaşam Kongresi, sözlü sunum.

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi GO 2018/106 sayılı Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu olur kararı.

## KAYNAKLAR

olmadığı belirtilmiştir (Şengül 2004). Yaptığımız çalışmada ise sadece cinsiyetin etkili olduğu, bu durumda erkek öğrencilerde 1-2 kg arası tavuk eti tüketenlerin sayısının daha fazla olması ve toplam tavuk eti tüketiminin erkek öğrencilerde bayan öğrencilere göre daha fazla olması durumlarından kaynaklanmaktadır. Hayvansal gıda tüketim düzeyini yeterli bulup bulmama fikri ile beyaz et tüketim miktarı arasında anlamlı ilişki bulunmamasının nedenin veteriner fakültesi öğrencilerinin büyük bir çoğunluğunun tüketim düzeyini yeterli görmeyişinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Kanatlı eti tüketiminde etkili olan faktörler bireysel aylık gelir, bireysel aylık gıda harcaması ve bireysel aylık hayvansal gıda harcama düzeyi olarak tespit edilmiştir. Aylık bireysel gelir arttıkça kanatlı eti tüketimi diğer çalışmalarla benzer olarak artmıştır (Sarıözkan ve ark. 2007). 500-749 TL aralığına kadar kanatlı eti tüketenlerin sayısı önce artmakta, sonrasında gelir artmaya devam ettikçe kanatlı eti tüketenlerin sayısı azalmaktadır. Gelir belirli bir noktaya kadar artarken kanatlı eti tüketimi önce artmakta, gelir artmaya devam ettikçe kanatlı eti tüketim miktarı azalmaktadır. Gelir artınca kanatlı eti haricindeki diğer et ve et ürünlerinin tercih edilmesinden dolayı bu durumun şekillendiği tahmin edilmektedir.

Gıda harcama oranları gruplar arasında dengeli sayılabilecek bir dağılım göstermesine karşın, hayvansal gıdalara yapılan harcama gruplarında ise düşük harcama gruplarında yoğunlaşmanın olması dikkat çekici niteliktedir. Öğrencilerin gıda bütçesinde fiyatları daha düşük nitelikte olan hayvansal olmayan gıdalara ağırlık verdiği, hayvansal ürünlerde asgari düzeyde bütçe ayırarak tüketimde buldukları anlaşılmaktadır.

Buradan hareketle Türkiye’de yaşanacak ekonomik iyileşme ve refah artışlarına bağlı olarak, öğrenci gelirlerinin artmasına imkân olarak sağlayacak gelişmelerle öğrencilerin bireysel gıda harcamaları da artacaktır. Buna bağlı olarak öncelikli olarak hayvansal gıdalara olan talep artacak, bunlar arasında da hayvansal et ve et ürünlerinde fiyatı ve ulaşılabilirliği ilk sırada gelen kanatlı etine olan talebin artması söz konusu olacaktır (Erdoğan ve Çiçek 2015). Gelir artması haricinde ise üretim maliyetlerinin aşağı çekilmesine olanak sağlayacak bir takım destek, teşvik ve tedbirlerinde dolaylı olarak tüketicilerin satın alma gücünü artıracağından dolayı, üniversite öğrencilerinin de kanatlı etine olan talebini arttıracaktır.

- Akçay A, Sarıözkan S, Al S.** Akademik personelin et tüketim tercihlerinin analitik hiyerarşi prosesi ile değerlendirilmesi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi.* 2018; 89(1): 11-24.
- Akın AC, Çevrimli MB, Arıkan MS, Tekindal MA.** Determination of the causal relationship between beef prices and the consumer price index in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 2019; 43: 353-358.
- Anonymous.** OECD, Kişi başı et tüketim miktarları. <https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm> Accessien date: 24.08.2019
- Aral Y, Aydın E, Demir P, Akın AC, Cevger Y, Kaya Kuyululu ÇY, Arıkan MS.** Consumer preferences and consumption situation of chicken meat in Ankara province, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 2013; 37(5): 582-587.
- Arıkan MS, Çevrimli MB, Akın AC, Tekindal MA.** Determining the change in retail prices of veal in Turkey by GARCH method between 2014-2017. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2019; 25(4): 499-505.
- Ayhan DE, Günaydın E, Gönüaçık E, Arslan U, Çetinkaya F, Asımı H, Uncu Y.** Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi öğrencilerinin beslenme alışkanlıkları ve bunları etkileyen faktörler. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2012; 38(2): 97-104.
- Bazga B, Ipate I, Ipate N.** Price volatility in context of food security for sustainable development. *Competitiveness of Agro-Food and Environmental Economy.* 2014; 198-204.
- Botev Z, Ridder A.** Variance Reduction. Wiley StatsRef: Statistics Reference Online: 1--6. 2017.
- Cevger Y, Aral Y, Demir P, Sarıözkan S.** Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi intern öğrencilerinde hayvansal ürünlerin tüketim durumu ve tüketici tercihleri. *AUVFD.* 2008; 55: 189-194.
- Erdoğan N, Çiçek H.** Hayvansal gıdaların tüketim yapısı ve tüketici tercihlerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma: Üniversite personeli örneği. *Kocatepe Veterinary Journal.* 2015; 8: 25-31.
- Erdoğan H, Çiçek H.** Modelling beef consumption in Turkey: the ARDL/bounds test approach. *Turk J Vet Anim Sci.* 2017; 41(2): 255-264.
- Eştürk Ö, Albayrak N.** Investigation of the relationship between agricultural products-food price increases and inflation. *ÜİİİD-IJEAS.* 2018; (18. EYİ Özel Sayı): 147-158.
- Gökhan EE.** The situation of animal product consumption and preferences among final-year students at Fırat University, faculty of veterinary medicine. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2013; 12(1): 38-41.
- Hernandez MA, Ibarra R, Trupkin DR.** How far do shocks move across borders? Examining volatility transmission in major agricultural futures markets. *European Review of Agricultural Economics.* 2013; 41(2): 301-325.

- İskender H, Kanbay Y, Özçelik E.** Artvin Çoruh Üniversitesi öğrencilerinin tavuk eti tüketim tercihleri. *SBVD*. 2015; 29: 09-13.
- Kızılaslan H, Nalıncı S.** Amasya ili merkez ilçedeki hane halkının kanatlı eti tüketim alışkanlıkları ve kanatlı eti tüketimini etkileyen faktörler. *GBAD*. 2013; 6: 1-18.
- Sarıözkan S, Cevger Y, Demir P, Aral Y.** Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğrencilerinin hayvansal ürün tüketim yapısı ve alışkanlıkları. *JHS*. 2007; 16: 171-179.
- Sarris A.** Food commodity price volatility and food insecurity. *Bio-based and Applied Economics*. 2013; 2(3): 213-236.
- Şengül S.** Türkiye’de gelir gruplarına göre gıda talebi. *ODTÜ Gelişim Dergisi*. 2004; 31: 115-148.
- Şentürk B.** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğrencilerinin hayvansal ürün tüketim harcamalarının analizi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*. 2011; 82: 71-78.
- Shahrokh Esfahani M, Dougherty ER.** Effect of separate sampling on classification accuracy. *Bioinformatics*. 2014; 30(2): 242–250.

## Microbiological Quality of Organic Chicken Meat

Reşat ÇİFTÇİ<sup>1</sup>, Hüsni Şahan GÜRAN<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry, Batman Directorate of Provincial Agriculture and Forestry, 72040, Batman, Turkey

<sup>2</sup>Dicle University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, 21280, Diyarbakır, Turkey

### ABSTRACT

Organic chicken production in the world increases every year according to the consumer demands. Therefore, a higher awareness of the microbial quality of organic poultry meat is important for public health, food safety and product shelf life. In this study was used 240 of frozen organic chicken meat, drumstick (n:80), breast (n:80) and leg quarter (n:80) as the material. Microbiological analyses were conducted to determine the counts of total mesophilic aerobic bacteria (TMAB), total psychotropic aerobic bacteria (TPAB), *Pseudomonas* spp., coliforms, *E. coli*, molds, and yeasts in all samples. It was determined that 100%, 100%, 100%, 81.6%, 54.1%, 34.1%, and 83.3% of the analyzed samples (N:240) were contaminated with TMAB, TPAB, *Pseudomonas* spp., coliforms, *E. coli*, molds and yeasts, respectively. Moreover, the mean counts of TMAB was  $4.99 \pm 0.80 \log_{10}$  cfu/g, the TPAB was  $5.29 \pm 0.96 \log_{10}$  cfu/g, the coliforms were  $3.53 \pm 0.92 \log_{10}$  cfu/g, *E. coli* was  $2.45 \pm 0.65 \log_{10}$  cfu/g, *Pseudomonas* spp. was  $4.63 \pm 1.10 \log_{10}$  cfu/g, mold was  $2.03 \pm 0.42 \log_{10}$  cfu/g and yeast was  $3.68 \pm 1.13 \log_{10}$  cfu/g. These results indicate that organic chicken meat can be contaminated with various microorganisms that affect the shelf life and hygienic quality.

**Keywords:** Chicken meat, Hygiene, Microbiological quality, Organic

\*\*\*

### Organik Tavuk Etlerinin Mikrobiyolojik Kalitesi

#### ÖZ

Organik tavuk eti üretimi tüketici tercihlerine bağlı olarak her geçen gün artmaktadır. Bu artışa bağlı olarak organik tavuk etlerinin mikrobiyal kalitesinin daha yakından bilinmesi hem halk sağlığı hem de gıda güvenliği ile ürünün raf ömrü bakımından önemlidir. Bu çalışmada bagnet (n:80), göğüs (n:80) ve kalçalı but (n:80) olmak üzere toplam 240 adet donmuş organik tavuk parça eti materyal olarak kullanıldı. Tüm örneklerde toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB), toplam psikrotrof aerobik bakteri (TPAB), *Pseudomonas* spp., koliform bakteri, *E. coli* ile küf ve maya sayısının tespiti için mikrobiyolojik analizler gerçekleştirildi. Analiz edilen tavuk parça etlerinin (N:240) sırasıyla % 100, % 100, % 100, % 81.6, % 54.1, % 34.1 ve % 83.3'ünün TMAB, TPAB, *Pseudomonas* spp., koliform, *E. coli*, küf ve maya ile kontamine olduğu belirlendi. Ayrıca örneklerdeki (N:240) ortalama TMAB sayısı  $4.99 \pm 0.80 \log_{10}$  kob/g, TPAB sayısı  $5.29 \pm 0.96 \log_{10}$  kob/g, koliform bakteri sayısı  $3.53 \pm 0.92 \log_{10}$  kob/g, *E. coli* sayısı  $2.45 \pm 0.65 \log_{10}$  kob/g, *Pseudomonas* spp. sayısı  $4.63 \pm 1.10 \log_{10}$  kob/g, küf sayısı  $2.03 \pm 0.42 \log_{10}$  kob/g ve maya sayısı  $3.68 \pm 1.13 \log_{10}$  kob/g düzeyinde bulundu. Bu sonuçlar organik tavuk etlerinin hem raf ömrü hem de hijyenik kalitesi üzerine etkili mikroorganizmalar ile kontamine olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Hijyen, Mikrobiyolojik kalite, Tavuk eti, Organik

To cite this article: Çiftçi R. Güran H.Ş. Microbiological Quality of Organic Chicken Meat. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4):463-468.

Submission: 07.08.2019 Accepted: 24.11.2019 Published Online: 02.12.2019

ORCID ID; HŞG: 0000-0002-6674-5510, RÇ: 0000-0003-1521-6085

\*Corresponding author e-mail: sahanguran@yahoo.com

## INTRODUCTION

Chicken meat is an essential source of animal origin food, which contains amino acids that are necessary for high human nutrition, and it is cheaper than red meat (Marangoni et al. 2015). However, with the changing consumer perception in the last 20 years, poultry production has become more environmentally friendly where animal welfare is more important (Harvey et al. 2016, Dervilly-Pinel et al. 2017). The term “organic” as defined in 2002 by the US Department of Agriculture (USDA), National Organic Program of the Agriculture Marketing Service, applies to specific methods of production of crops and livestock aimed to protect natural resources and conserve biodiversity. In this production system, crops are verified as organic when certain agricultural practices are not performed or specific compounds are not used, including sewage sludge, synthetic fertilizers, genetically modified organisms, and prohibited pesticides. Organic chicken production system aims to raise the wellbeing conditions of animals by raising them in a environment similar to the natural life of the chickens and minimize the chemical risks that may arise from the meat obtained from these chickens (Fanatico et al. 2007, İpek and Sözcü 2015). Statistical data show that the total organic chicken meat production in the European Union was 41 million in 2015 and reached 43 million in 2016 (Anonymous 2018a, Anonymous 2018b) while the organic broiler production in the United States was 9 million in 2008 and reached 22 million in 2016. Organic broiler meat sales in the United States were 451 million USD in 2014 and reached 750 million in 2016 (Anonymous 2018d, Anonymous 2017b, Anonymous 2017a). According to the data of the Ministry of Agriculture and Forest in Turkey, the number of organic broiler farms was 5 in 2012 and reached 23 in 2015. These data indicate that the organic chicken production increases every year to reach a broad consumer mass in the world. Moreover, it requires a better knowledge of the microbiological risks of chicken meat regarding public health and food safety. However, according to the national and international food codices, the organic poultry meat is evaluated based on the determined microbiological parameters and the limits for chicken meat produced by conventional methods. Therefore, the microbial risks related to organic chicken meat are not evaluated on a broader scale regarding food safety and public health; thus, the consumer awareness of microbial hazards remains at a lower level (Harvey et al. 2016). Previous limited studies have shown that like conventional chicken meat, organic chicken meat can also be contaminated with microorganisms in stages from production to consumption. In a study on the microbiological profile of organic chicken meat have reported that the total mesophilic aerobic bacteria, coliform and *E. coli* counts to be 2.8 log cfu/ml, 1.5 log cfu/ml and 1.3 log cfu/ml,

respectively and determined the *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. prevalence to be 20% and 28%, respectively (Scheinberg et al. 2013). Kijlstra and Eijck (2006) have reported that 27% of the organic broiler meat was contaminated with *Campylobacter jejuni* and 73% with *Campylobacter coli*, whereas Van Loo et al. (2012) reported 49% of the organic chicken carcasses were contaminated with *L. monocytogenes*.

Previous studies on this subject showed that the scientific studies usually focus on the microbiological quality of conventional chicken meat or the presence of pathogenic microorganisms in organic chicken meat (Lestari et al. 2009, Kim et al. 2017). The present study aims to determine the level of contamination regarding microorganisms used as hygiene indicator (coliform and *E. coli*) and deteriorative indicator (total mesophilic aerobic bacteria, total psychotropic aerobic bacteria, *Pseudomonas* spp., mold, and yeast) in organic chicken meat parts offered to consumers.

## MATERIAL and METHOD

### Sample collection

Within the scope of the regulations in Turkey, the products of the brands of the companies that produce organic chicken meat can be obtained from the super markets and online shopping stores. Thus, 240 organic frozen chicken meat parts (80 each of drumsticks, breasts, and leg quarters) sold in the super markets in Diyarbakir city and online shopping stores that operating at the national level were used as the study material. Frozen chicken meat parts were defrosted at refrigerator. Microbiological analyses were conducted immediately after the defrosting process. The production dates and expiration dates of the chicken meat samples collected were within limits determined by the relevant legislation.

### Sample preparation

For the microbiological analysis of each chicken sample, 10 g of each chicken sample was taken under aseptic conditions using a sterile pensette and scalpel and placed in a sterile sampling bag (Bag Filter, France). Then, 90 mL 0.1% sterile peptone water (LAB M, UK) was added to each sampling bag containing 10 g sample and homogenized for 2 minutes in a stomacher (Easy Mix-G560E, France). To determine the number of microorganisms in each sample, the decimal dilutions were prepared in the tubes with 9 ml of 0.1% sterile peptone water.

### Total mesophilic aerobic bacteria (TMAB):

Enumeration of TMAB was performed by using Plate Count Agar (PCA) (LAB M, UK). Duplicate pour plates were made from each dilution. Plates were incubated at 37 °C for 24-48 h. All colonies from the appropriate dilution were counted as mesophilic aerobic bacteria (Harrigan 1998).

**Total psychotropic aerobic bacteria (TPAB):** Enumeration of TPAB was performed by using Plate Count Agar (PCA) (LAB M, UK). Duplicate pour plates were made from each dilution. Plates were incubated at 5 °C for 7 days. All colonies from the appropriate dilution were counted as psychotropic aerobic bacteria (Harrigan 1998).

**Coliform bacteria:** Enumeration of coliforms was performed by using Violet Red Bile Lactose Agar (VRBLA) (Merck, Germany). Duplicate pour plates were made from each dilution. The plates were incubated at 37 °C for 24-48 h. Pink-red colonies from the appropriate dilution were counted as coliform bacteria (Harrigan 1998).

***E. coli*:** For the enumeration of *E. coli* was used Tryptone Bile X Glucuronide (TBX) Agar (Merck, Germany). Duplicate pour plates were made from each dilution. Plates were incubated at 44 °C for 24 h. Typical blue-green colonies from the appropriate dilution were counted as *E.coli* (ISO 2001).

***Pseudomonas* spp.:** To determine *Pseudomonas* spp., the prepared dilutions were inoculated onto Pseudomonas Agar (Oxoid, UK) plates containing Pseudomonas CFC Selective Supplement (Oxoid, UK) and glycerol. Duplicate spread plates were made from each dilution. These plates were incubated for 48 hours at 30 °C, and then end of the incubation all colonies were enumerated as *Pseudomonas* spp. (Harrigan 1998).

**Mold and yeast:** To determine mold and yeast counts, 10% tartaric acid added Potato Dextrose Agar

(PDA) (LAB M, UK) was used. Duplicate pour plates were made from each dilution, and then the plates were incubated for five days at 22 °C (Andrew 1992). Following the incubation, the colonies with soft mucoid consistency, oval or rounded edges were evaluated as yeast, whereas those with a “puffy cotton” mycelium appearance were evaluated as molds.

**Data analysis**

In this study, the minimum detectable limit for *Pseudomonas* spp. was designated to be 10<sup>2</sup> and 10<sup>1</sup> for the remaining microorganisms. The colonies growing in petri dishes were enumerated and recorded as cfu/g. Then, these data were converted to log<sub>10</sub> cfu/g unit and evaluated using standard deviation, minimum-maximum values and averages in the SPSS (16.0) software program.

**RESULTS**

It was determined that 100%, 100%, 100%, 81.6%, 54.1%, 34.1%, and 83.3% of the analyzed samples (n:240) were contaminated with TMAB, TPAB, *Pseudomonas* spp., coliform, *E. coli*, mold and yeasts, respectively (Table 1). In chicken meat parts, the mean TMAB count was 4.99±0.80 log<sub>10</sub> cfu/g; the mean TPAB count was 5.29±0.96 log<sub>10</sub> cfu/g, the mean coliform count was 3.53±0.92 log<sub>10</sub> cfu/g, the mean *E. coli* count was 2.45±0.65 log<sub>10</sub> cfu/ g, the mean *Pseudomonas* spp. count was 4.63±1.10 log<sub>10</sub> cfu/ g, the mean mold count was 2.03±0.42 log<sub>10</sub> cfu/g, and the mean yeast count was 3.68±1.13 log<sub>10</sub> cfu/g (Table 1).

**Table 1.** Distribution and number of microorganisms detected in organic chicken meat parts (log<sub>10</sub> cfu/g)

Microorganism	The average microorganism numbers in the analyzed samples (N: 240)			Distribution of microorganisms according to chicken meat parts		
	Minimum	Maximum	Mean ± SD*	Drumstick <sup>‡</sup>	Breast <sup>‡</sup>	Leg quarter <sup>‡</sup>
TMAB	3.04	6.90	4.99±0.80	5.15±0.63	5.10±0.95	4.71±0.72
TPAB	3.25	7.94	5.29±0.96	5.65±0.80	5.12±1.0	5.10±0.98
Coliform	1.30	5.60	3.53±0.92	3.65±0.75	3.71± 1.13	3.08±0.67
<i>E. coli</i>	1.27	3.99	2.45±0.65	2.41±0.66	2.67±0.65	2.18±0.52
<i>Pseudomonas</i> spp.	2.00	6.32	4.63±1.10	5.16±0.47	4.30±0.82	4.44±1.53
Mold	1.27	3.04	2.03±0.42	2.08±0.45	2.07±0.35	1.93±0.42
Yeast	1.30	5.44	3.68±1.13	3.66±1.06	4.10±0.98	3.36±1.21

\*SD: Standard deviation

‡: The number of analyzed samples (n: 80)



## DISCUSSION

Organic food sector has become a fast-growing sector in the international food market during the past decade (Willer and Lernoud 2016). The increased consumer sensitivity to healthy eating and eco-friendly products has contributed to this rapid growth. Like conventional foods, possible microbial contaminations in organic foods can cause serious problems regarding public health and food safety. Moreover, these contaminants can cause undesirable conditions including shortening of the shelf-life or deterioration. Therefore, like conventional chicken meat, it is important to know the microbiological quality of organic chicken meat to prevent the risks mentioned above or undesirable consequences. The information on TMAB in meat and meat products is used as an indicator to determine whether the production and preservation are performed under appropriate conditions (Sofos 1994). In the present study, the TMAB in the chicken drumstick, breast, and leg quarter samples were found to be  $5.15 \pm 0.63 \log_{10}$  cfu/g,  $5.10 \pm 0.95 \log_{10}$  cfu/g, and  $4.71 \pm 0.72 \log_{10}$  cfu/g, respectively, and the TMAB did not exceed the maximum acceptable level for chicken meat  $7 \log_{10}$  cfu/g determined by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods in any sample (Table 1) (ICFMH 1986). Scheinberg et al. (2013) reported the average TMAB in 50 fresh organic chicken carcasses (analyzed by the rinse method) as  $2.8 \pm 0.7 \log_{10}$  cfu/ml, while Hardy et al. (2013) reported the highest and the lowest TMAB in 50 fresh organic chicken carcasses at  $3.4 \log_{10}$  cfu/ml and  $4.8 \log_{10}$  cfu/ml, respectively. The higher results obtained in our study were associated with variables including the number of samples analyzed, sample type, and the analysis methods used in the studies and geographical differences.

Psychotropic bacteria, *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens* and the psychotrophic strains of *Enterobacteriaceae* are the dominant bacteria in the microbiological flora in chilled or frozen chicken meats (Gallo et al. 1988, Mead 2004a, Adams and Moss 2007, Ray and Bhunia 2007). Information on the microbiological load regarding these bacteria is regarded as important regarding preservation of product quality (Russell 2000, Alvarez-Astorga et al. 2002). Depending on the type of microorganism, the level of deterioration can vary between  $10^6$  cfu/g and  $10^8$  cfu/g, and like other food products, TPAB and *Pseudomonas* spp. counts higher than  $10^8$  cfu/g in chicken meat indicate deteriorated product (Adams and Moss 2007). In the present study, the average TPAB was  $5.29 \pm 0.96 \log_{10}$  cfu/g, and *Pseudomonas* spp. was  $4.63 \pm 1.10 \log_{10}$  cfu/g. Moreover, the TPAB and *Pseudomonas* spp. counts did not exceed  $10^8$  cfu/g in any sample; however, in 6.2% of the drumstick and breast samples and 3.7% of the breast samples, the TPAB was found to be  $10^7$  cfu/g. There are no

previous studies that determine the TPAB and *Pseudomonas* spp., counts in the frozen organic chicken meat while the TPAB in conventional chicken meat was between  $3.11 \log_{10}$  cfu/g and  $5.63 \log_{10}$  cfu/g, and *Pseudomonas* spp. counts varied between  $1 \log_{10}$  cfu/g and  $4.62 \log_{10}$  cfu/g (Efe and Gümüşsoy 2005, Günşen and Büyükyörük 2005, Patsias et al. 2008, Atlan and İşleyici 2012, Santosh et al. 2014). In the Turkish Food Codex Microbiological Criteria Regulation (Anonymous 2018c), there is no limit for the TPAB or *Pseudomonas* spp. counts in fresh or frozen chicken meat.

The detection of an indicator in food or the presence of this indicator microorganism above a certain limit in the food indicates that food may be contaminated with pathogenic microorganisms. Coliform and *E. coli* bacteria are the most widely used indicator microorganisms (Rangel 2005, Lima et al. 2017). Coliform group bacteria are considered as indicators of a direct or indirect fecal contamination, while *E. coli* is considered as a direct indicator of fecal contamination. Therefore, the detection of coliform and *E. coli* bacteria in poultry meat is often adopted to determine the hygienic quality of the product. In the present study, of the 240 frozen organic chicken meat parts, coliforms were detected in 81.6% and *E. coli* was detected in 54.1%. The average coliform counts in drumstick, breast and leg quarter samples were  $3.65 \pm 0.75 \log_{10}$  cfu/g,  $3.71 \pm 1.13 \log_{10}$  cfu/g and  $3.08 \pm 0.67 \log_{10}$  cfu/g, respectively while the average *E. coli* counts were  $2.41 \pm 0.66$ ,  $2.67 \pm 0.65$  and  $2.18 \pm 0.52 \log_{10}$  cfu/g, respectively (Table 1). In contrast to our results, Scheinberg et al. (2013) determined that the coliform ( $1.5 \log_{10}$  cfu/ml) and *E. coli* ( $1.3 \log_{10}$  cfu/ml) count in organic fresh chicken meats obtained by the rinse method were lower. The differences between the results could be related to the inadequacy of the rinse method used for microorganism recovery by these researchers in the detection of microorganisms (Jørgensen et al. 2002, Fletcher 2006, Berrang et al. 2017). In the Turkish Food Codex Microbiological Criteria Regulation (2011) there are no limits for *E. coli* and the coliform counts in chicken meat. Mold and yeasts are a part of the aerobic flora and contaminate the products through environmental sources such as air, water, soil, tools, and equipment. Although these organisms do not cause foodborne poisoning, they play an important role in the degradation of food and the shortening of shelf life (Petruzzi et al. 2017, Synder and Worobo 2018). In the present study, the average mold counts in drumstick, breast and leg quarter samples were found to be  $2.08 \pm 0.45 \log_{10}$  cfu/g,  $2.07 \pm 0.35 \log_{10}$  cfu/g,  $1.93 \pm 0.42 \log_{10}$  cfu/g, respectively, while the average yeast counts were found to be  $3.66 \pm 1.06 \log_{10}$  cfu/g,  $4.10 \pm 0.98 \log_{10}$  cfu/g,  $3.36 \pm 1.21 \log_{10}$  cfu/g, respectively. Moreover, 34.1% of 240 chicken meat parts were contaminated with mold, and 83.3% of them were contaminated

with yeasts. There are no results reported on the mold and yeast counts in organic chicken meats in the literature while Kingsbury (2006) have reported that only 6% of the chicken samples were contaminated with mold and yeasts.

In organic poultry production, restrictions on the use of antibiotics and antiparasitic drugs, and outdoor breeding of the animals play a role in increasing the microbial risks of organic poultry meat (Thamsborg 2001, Engvall 2001, Mead 2004b). The TMAB, TPAB, *E. coli*, coliform, *Pseudomonas* spp., mold and yeast counts in the present study were different (lower or higher results) from the results of the studies carried out with conventional frozen chicken meats depending on the type of microorganism (Eglezos et al. 2008, Patsias et al. 2008, Atlan and İşleyici 2012, Santosh et al. 2014, Fernandes et al. 2016). Thus, it is difficult to ascertain that the TMAB, TPAB, *E. coli*, coliform, *Pseudomonas* spp., mold and yeast counts in organic chicken meat analyzed in this study were higher than those reported in conventional chicken meat.

## CONCLUSION

This is the first study to determine the counts of some microorganisms affecting the hygienic quality and the shelf-life of frozen organic chicken meat parts sold at the retail level in Turkey. Especially, the presence of coliform (81.6%) and *E. coli* (54.1%) bacteria in organic chicken meat parts indicates that fecal pathogenic microorganisms can be found in organic chicken meats. The hygienic conditions at all stages (from the farm to the table), compliance with the implementation of international food safety systems, and consumption of the organic chicken meats following an adequate/efficacious heat treatment according to the general hygiene rules are essential to increase the shelf-life and reduce the microbial risks of organic chicken meat.

## ACKNOWLEDGEMENT

*This research was financially supported by Dicle University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project number: DUBAP/Veteriner.16.002).*

*This study was arranged from a part of the first author's M.Sc. thesis.*

*We thank Ugur Seker for his excellent laboratory assistance.*

## REFERENCES

- Adams MR, Moss M. Food Microbiology, Royal Society of Chemistry. Great Britain, England. 2007; pp. 119-136.
- Álvarez-Astorga M, Capita R, Alonso-Calleja C, Moreno B, García-Fernández C. Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Sci.* 2002; 62(1): 45-50.
- Andrew W. Manual of food quality control 4. Rev. 1. Microbiological analysis. FAO of the United Nations. Rome. FAO Food Nutr. 1992; pp. 14(4).
- Anonymous (2018a). IFOAM EU Group, Organic in Europe (Prospects and Developments 2016). [https://www.ifoameu.org/sites/default/files/ifoameu\\_organic\\_in\\_europe\\_2016.pdf](https://www.ifoameu.org/sites/default/files/ifoameu_organic_in_europe_2016.pdf); Accession data: 21.06.2018
- Anonymous (2018b). The World of Organic Agriculture (2018). [www.organic-world.net/yearbook/yearbook-2018/pdf.html](http://www.organic-world.net/yearbook/yearbook-2018/pdf.html); Accession data: 20.06.2018
- Anonymous (2018c). Turkish Food Codex Microbiological Criteria Regulation (2011). [https://www.tarimorman.gov.tr/Belgeler/ENG/Legislation/regulation\\_microbiological\\_criteria.pdf](https://www.tarimorman.gov.tr/Belgeler/ENG/Legislation/regulation_microbiological_criteria.pdf); Accession data: 05.08.2018
- Anonymous (2017a). U.S. Poultry and Egg Association. <https://www.uspoultry.org>; Accession data: 19.05.2017
- Anonymous (2017b). USDA Foreign Agricultural Service. <https://apps.fas.usda.gov>; Accession data; 30.03.2017
- Anonymous (2018d). USDA National Agricultural Statistics Service.
- Atlan M, İşleyici Ö. Van İli'nde dondurulmuş olarak satışı sunulan bazı et ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg.* 2012; 7(2): 93-103.
- Berrang ME, Cox NA, Cosby DE, Frye JG, Jackson CR. Detection of Salmonella serotypes by overnight incubation of entire broiler carcass. *J Food Saf.* 2017; 37(2): 1-4.
- Dervilly-Pinel G, Guérin T, Minvielle B, Travel A, Normand J, Bourin M, Nicolas M. Micropollutants and chemical residues in organic and conventional meat. *Food Chem.* 2017; 232: 218-228.
- Efe M, Gümüşsoy KS. Ankara garnizonunda tüketime sunulan tavuk etlerinin mikrobiyolojik analizi. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bil Derg.* 2005; 14(3): 151-157.
- Eglezos S, Dykes GA, Huang B, Fegan N, Stuttard ED. Bacteriological profile of raw, frozen chicken nuggets. *J Food Prot.* 2008; 71(3): 613-615.
- Engvall A. May organically farmed animal spouse a risk for Campylobacter infections in humans? *Acta Vet Scand.* 2001; 95: 85-87.
- Fanatico AC, Pillai PB, Emmert JL, Owens CM. Meat quality of slow-and fast-growing chicken genotypes fed low-nutrient or standard diets and raised in doors or without door access. *Poult Sci.* 2007; 86(10): 2245-2255.
- Fernandes RTV, Arruda AMVD, Costa MKDO, Lima PDO, Santos LOGD, Melo ADS, Marinho JBM. Physico chemical and microbiological parameters of frozen and chilled chicken meat. *Rev Bras Zootecn.* 2016; 45(7): 417-421.
- Fletcher DL. Influence of sampling methodology on reported incidence of Salmonella in poultry. *J AOAC Int.* 2006; 89(2): 512-516.
- Gallo L, Schmitt RE, Schmidt-Lorenz W. Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers I. Bacterial flora and growth during storage. *LWT- Food Sci. Technol.* 1988; 21(4), 216-223.
- Günşen U, Büyükyörük İ. Bazı dondurulmuş gıdalarda mikrobiyolojik kalite. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi.* 2005; (7): 36-44.
- Hardy B, Crilly N, Pendleton S, Andino A, Wallis A, Zhang N, Hanning I. Impact of rearing conditions on the

- microbiological quality of raw retail poultry meat. *J Food Sci.* 2013; 78(8): M1232-M1235.
- Harrigan WF.** Laboratory methods in food microbiology, 3rd ed., San Diego. 1998; Academic Press, 532.
- Harvey RR, Zakhour CM, Gould LH.** Food borne disease outbreaks associated with organic foods in the United States. *J Food Prot.* 2016; 79(11): 1953-1958.
- ICMSF.** Microorganisms in foods 2. In: Sampling for microbiological analysis: Principles and Scientific Applications. International Commission on Microbiological, 1986.
- İpek A, Sözcü A.** Alternatif kanatlı yetiştirme sistemlerinde yetiştirme pratikleri ve refah Standartları. *Bursa Uludağ Üniv Ziraat Fak Derg.* 2015; 29(1): 133-146.
- ISO.** International Standard Organization, Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *E. coli*. Colony-count technique at 44 °C using. 2001; 16649-2.
- Jørgensen F, Bailey R, Williams S, Henderson P, Wareing DRA, Bolton FJ, Humphrey TJ.** Prevalence and numbers of Salmonella and Campylobacter spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *Int. J Food Microbiol.* 2002; 76(1): 151-164.
- Kijlstra A, Eijck IAJM.** Animal health in organic livestock production systems: a review. *NJAS - Wageningen J Life Sci.* 2006; 54(1): 77-94.
- Kim YJ, Park JH, Seo KH.** Comparison of the loads and antibiotic-resistance profiles of Enterococcus species from conventional and organic chicken carcasses in South Korean. *J Poult. Sci.* 2017; 97(1): 271-278.
- Kingsbury LA.** Comparisons of microbial counts in organic chickens and commercially. MS Thesis, University of Wisconsin, 2006.
- Lestari SI, Han F, Wang F, Ge B.** Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella serovars in conventional and organic chickens from Louisiana retail stores. *J Food Prot.* 2009; 72(6): 1165-1172.
- Lima WKDS, Barros LSS, Da Silva RM, De Deus TB, Silva ADS, Lima DDV.** Patogenic and indicator microorganisms in chicken cuts sold in the Recôncavo-Bahia-Brazil. *J Food Nutr. Sci.* 2017; 8(11): 1028.
- Marangoni F, Corsello G, Cricelli C, Ferrara N, Ghiselli A, Lucchin L, Poli A.** Role of poultry meat in a balanced diet aimed at maintaining health and wellbeing: an Italian consensus document. *Food Nutr Res.* 2015; 59(1): 27606.
- Mead GC.** Meat quality and consumer requirements. Poultry meat processing and quality Cambridge, Wood head Publishing Limited CRC Press, 2004a; 1-21.
- Mead GC.** Microbiological quality of poultry meat: a review. *Journal Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 2004b; 6(3): 135-142.
- Patsias A, Badeka AV, Savva IN, Kontominas MG.** Combined effect of freeze chilling and MAP on quality parameters of raw chicken fillets. *Food Microbiol.* 2008; 25(4): 575-581.
- Petruzzi L, Corbo MR, Sinigaglia M, Bevilacqua A.** Microbial spoilage of foods fundamentals. In the microbiological quality of food, 20017; 1-21.
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL.** Epidemiology of *Escherichia coli* O157: H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *J Emerg Infect Dis.* 2005; 11(4): 603
- Ray B, Bhunia A.** Fundamental Food Microbiology, Boca Raton, Florida, 2007; pp 261-266.
- Russell SM.** Spoilage bacteria associated with poultry. In Poultry meat processing, 2000; 169-190 CRC Press.
- Santosh Kumar HT, Pal UK, Sudheer K, Mandal PK, Das CD.** Changes in the quality of dressed chicken obtained from different sources during frozen storage. *Exploratory Animal and Medical Research*, 2014; 4(1): 95-100.
- Scheinberg J, Doores S, Cutter CN.** A microbiological comparison of poultry products obtained from farmers' markets and supermarkets in Pennsylvania. *J Food Saf.* 2013; 33(3): 259-264.
- Snyder AB, Worobo RW.** Fungal spoilage in food processing. *J Food Prot.* 2018; 81(6): 1035-1040.
- Sofos JN.** Microbial growth and its control in meat, poultry and fish. In: Quality specifications for foods. Toronto, University of Toronto Press. 1994; 181-196.
- Thamsborg SM.** Organic farming in the Nordic countries: Animal health and production. *Acta Vet Scan.* 2001; 95: 7-15.
- Van Loo EJ, Alali W, Ricke SC.** Food safety and organic meats. *Annu Rev of Food Sci Technol.* 2012; 3: 203-225.
- Willer H, Lernoud J.** The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends, 2016; pp.1-336. Research Institute of Organic Agriculture FiBL and IFOAM Organics International.

## Ebstein Anomaly in a French Mastiff

Turan CİVELEK<sup>1\*</sup>, D. Fatih BAŞER<sup>1</sup>, Z. Kadir SARITAŞ<sup>2</sup>, A. Cihat TUNÇ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Afyonkarahisar, Turkey.

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Afyonkarahisar, Turkey.

### ABSTRACT

The material of this case report was a 1.5-year-old French Mastiff dog who was brought to Afyon Kocatepe University Animal Hospital with complaints of latergia, ascites and exercise- intolerance. Auscultation revealed severe systolic murmur and arrhythmia at tricuspid valve level. Radiological examination revealed pleural effusion, right atrial dilatation and total heart enlargement. After echocardiographic examination, right atrial dilatation, moderate tricuspidal valve insufficiency due to tricuspidal maformation and tricuspid leaflets were located in approximately 2cm apex according to mitral valve leaflets. M-mode examination revealed signs of heart failure (EF = 13, FS = 6). In abdominal USG, hematomegaly and ascites were the main findings. In the treatment procedure, ascites and pleural effusion were evacuated in a controlled manner. Medically; amoxicillin clavunic acid (25mg / kg / IM, one week), furosemide (2mg / kg, PO), enalapril (0.5mg / kg, PO), pimobendan (0.5mg / kg, PO) and cardiac diet were prescribed to the patient. Digoxin (0.008mg / kg) was used for arrhythmia. The patient, who had regular controls, died eight months after the start of treatment. Due to the typical echocardiographic findings, Ebstein's anomaly can be easily recognized by a cardiologist. However, it is also a fact that it is often overlooked. Therefore, the actual incidence may be higher.

**Keywords:** Echocardiography, right heart failure, ascites, pleural effusion, dog, Ebstein anomaly.

\*\*\*

### Bir Fransız Mastiff'te Ebstein Anomali

#### ÖZ

Bu olgu sunumunun materyalini, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Hastanesine letarji, asites ve ekzersiz intoleransı şikayetleriyle getirilen 1.5 yaşlı Fransız Mastiff köpek oluşturdu. Oskültasyonda triküspit kapak seviyesinde şiddetli sistolik murmur ve aritmi tespit edildi. Radyolojik incelemede pleural effüzyon, sağ atrial dilatasyon ve total kalp büyümesi belirlendi. Sonrasında gerçekleştirilen ekokardiyografik muayenede sağ atrial dilatasyon, triküspital maformasyona bağlı olarak orta derecede triküspital kapak yetmezliği ve triküspit yaprakçıklarının mitral kapak yaprakçıklarına göre, yaklaşık 2cm apekte yerleşim gösterdiği tespit edildi. M-mod muayenede kalp yetmezliği bulguları belirlendi (EF=13, FS=6). Abdominal USG'de ise hematomegali ve asites ana bulguları. Tedavi prosedüründe; asit ve pleural effüzyon kontrollü bir şekilde boşaltıldı. Medikal olarak; amoksisilin klavunik asit (25mg/kg/IM, bir hafta), furosemid (2mg/kg, PO), enalapril (0.5mg/kg, PO), pimobendan (0,5mg/kg, PO) ve kardiyak diyet reçete edildi. Aritmi için digoxin (0.008mg/kg) kullanıldı. Düzenli kontrolleri gerçekleştirilen hasta tedavi başlangıcından sekiz ay sonra kaybedildi. Ebstein anomali sahip olduğu tipik ekokardiyografik bulgular nedeniyle "uzman" bir kardiyolog tarafından kolayca tanınabilir. Ancak çoğu zaman gözden kaçırıldığı da bir gerçektir. Bu nedenle reel insidansı daha yüksek olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Ekokardiyografi, sağ kalp yetmezliği, pleural effüzyon, köpek, Ebstein anomali

To cite this article: Civelek T. Başer D.F. Saritaş Z.K. Tunç A.C. Ebstein Anomaly in a French Mastiff. Kocatepe Vet J. (2019) 12(4): 469-473.

Submission: 31.08.2019 Accepted: 18.09.2019 Published Online: 15.10.2019

ORCID ID; TC: 0000-0002-4819-3484, DFB: 0000-0003-4272-9011, ZKS: 0000-0002-7659-6635,

ACT: 0000-0002-6296-6762

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

## GİRİŞ

Ebstein anomali triküspid kapağın malformasyonlarından (triküspit dispilazi) biridir (Takemura ve ark. 2003). İlk olarak 1866'da *Wilhelm Ebstein* tarafından tanımlanmıştır. Heterojen faktörlerin bu anomaliden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Narin 2008). Ebstein anomalide triküspit kapağın septal ve basal yaprakçığının mitral kapağa göre apekse yakın yerleşimi söz konusudur. Bildirilen vakalar iki yaşın altındadır. Vakalarda klinik olarak ekzersiz intöleransı, sistolik triküspital murmur, asites ve letarji bildirilmiştir. Ebstein anomali köpeklerde ve insanlarda sık gözlenmeyen konjenital bir kalp hastalığıdır (Eyster ve ark. 1977, Cave 2001, Takemura ve ark. 2003, Deprest ve ark. 2006, Narin 2008, Choi ve ark. 2009, Neetu 2017).

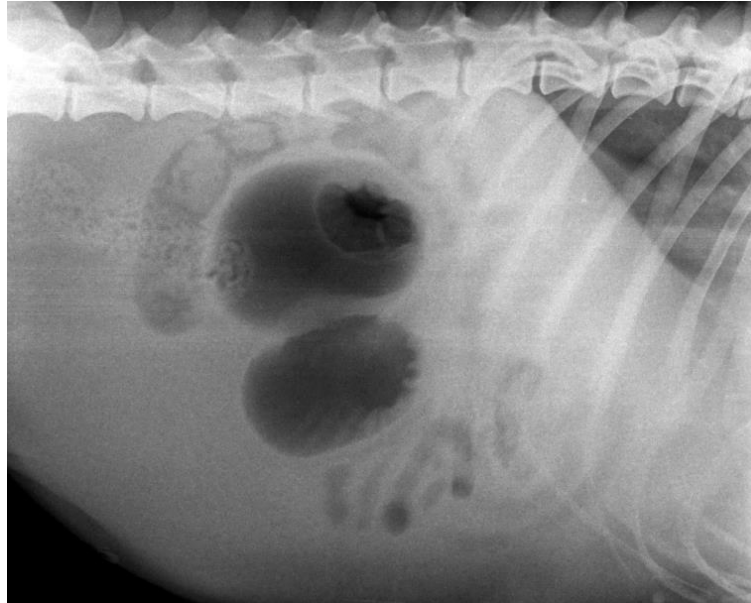
Sunulan bu vaka Türkiye'de bildirilen üçüncü (Yılmaz ve ark. 2015, Alihosseini ve ark. 2018), dünyada bir Fransız Mastiff'te ise bildirilen ikinci vakadır (Netuu ve ark. 2017). Bu yönleriyle literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

### Vaka Raporu

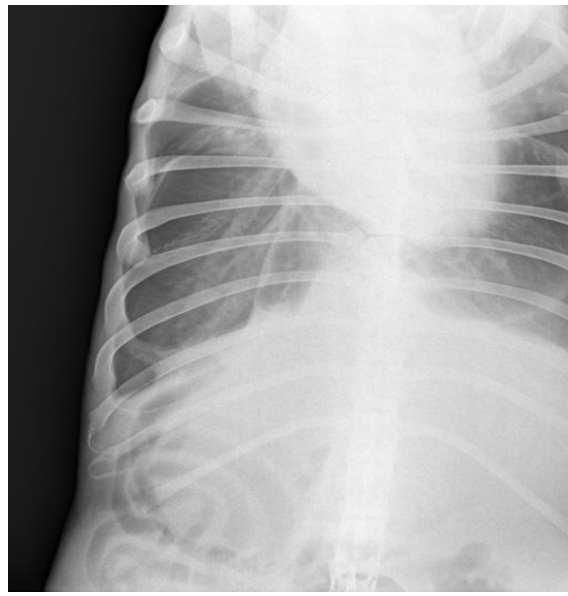
Bu olgunun materyalini, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Hastanesine laterji, asites, ekzersiz intöleransı şikayetleriyle başvuran 1.5 yaşlı, erkek Fransız Mastiff köpek oluşturdu. Oskültasyonda triküspit kapak seviyesinde şiddetli sistolik murmur ve aritmi tespit edildi. Biyokimyasal ve hematolojik ölçümler referans sınırlar içerisindeydi. Yapılan torasik ve abdominal

radyolojik incelemede asites, pleural effüzyon, total kalp büyümesi ve sağ atrial dilatasyon tespit edildi (Resim1, 2). Kardiyoloji servisimizde M-mode, 2D, renkli ve CW doppler ekokardiyografik muayene gerçekleştirildi (Resim3-6). Ekokardiyografik olarak; sağ atrial dilatasyon ve triküspital yaprakçıkların mitral kapak yaprakçıklarına göre yaklaşık 2 cm. apekse yerleşim gösterdiği belirlendi. Triküspital malformasyona bağlı olarak triküspital kapak yetmezliği tespit edildi (TRV=253.8 cm/s). Sol kalp fonksiyonları M-mod muayene ile değerlendirildi. Muayenede sol kalp yetmezliği bulguları tespit edilmiştir (EF=13, FS=6). Hastada, radyolojik muayene ile uyumlu olarak, pleural effüzyon görüldü. Yapılan abdominal USG incelemede hematomegali ve asites belirlendi. Torakosentez sonucu alınan örnekte total kolesterol (TC) (143.2 mg/dl) ve trigliserid (TG) (645.01 mg/dl) ölçümleri yapıldı ve şilotoraks tanısı kondu.

Tedavide; düzenli aralıklarla gelişen asit ve pleural effüzyon kontrollü bir şekilde ve yavaş olarak boşaltıldı. Hasta medikal olarak; amoksisilin klavunik asit (25mg/kg/IM, bir hafta), furosemid (2mg/kg, PO), enalapril (0.5mg/kg, PO), pimobendan (0,5mg/kg, PO) ve kardiyak diyet ile tedavi altına alındı. Aritmi için digoxin (0.008mg/kg) kullanıldı. Hastamız, rutin olarak, her 15 günde bir kez kontrole çağırıldı. İlk kontrollerde hastada klinik düzelme tespit edildi. İlk tedaviden 8 ay sonra hasta kaybedilmiştir.

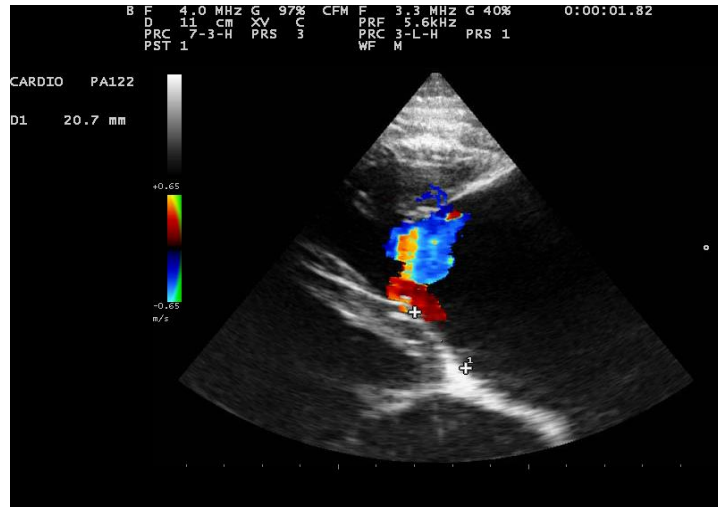


**Resim 1.** Abdominal radyografide asites görünümü  
**Figure 1.** Abdominal radiography ascites image



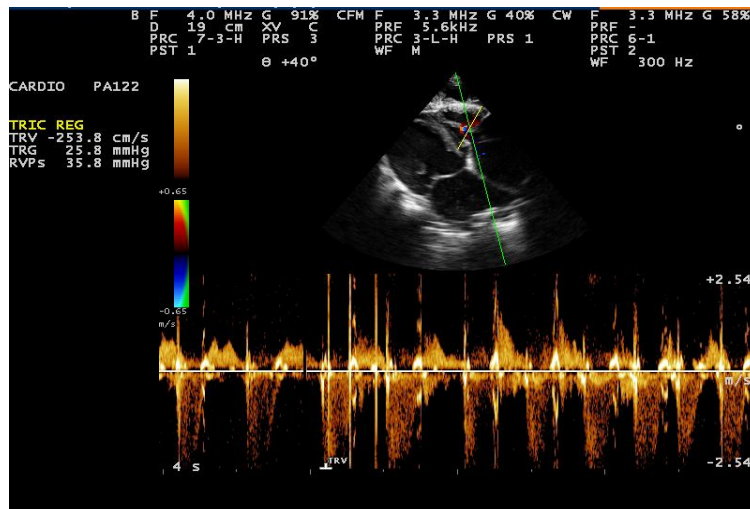
**Resim 2.** Toraks radyografide ters D formü ve pleural effüzyon

**Figure 2.** Inverse D form and pleural effusion on thorax radiography



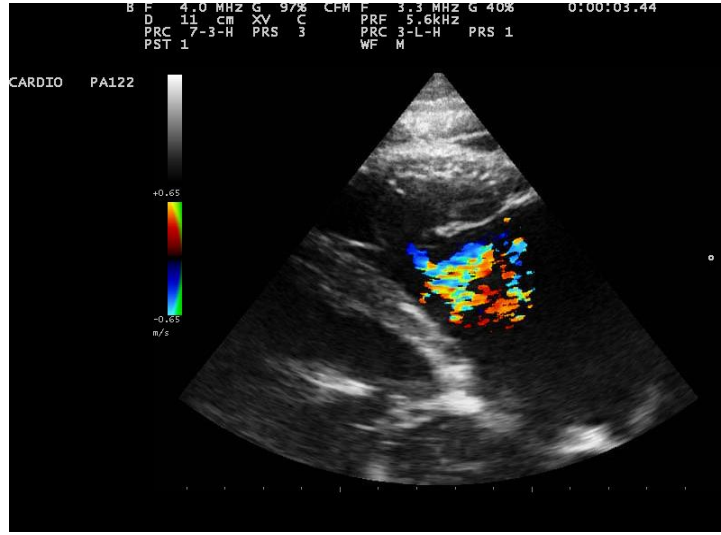
**Resim 3.** Ekokardiyografik muayenede triküs pit kapağın mitral kapağa göre apekse yerleşimi

**Figure 3.** Echocardiographic examination of the tricuspid valve more mitral valve than the placement of the apex

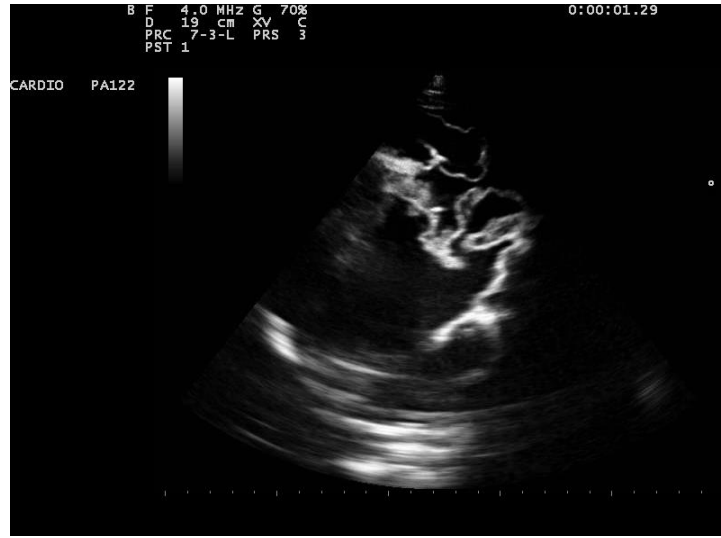


**Resim 4.** Ekokardiyografik muayenede triküs pital yetmezlik

**Figure 4.** Tricuspidal insufficiency in echocardiographic examination



**Resim 5.** Ekokardiyografik muayenede triküspital yetmezliğin renkli doppler görüntüsü  
**Figure 5.** Color doppler image of tricuspid insufficiency in echocardiographic examination



**Resim 6.** Ekokardiyografik muayenede pleural effüzyon.  
**Figure 6.** Pleural effusion on echocardiographic examination.

## TARTIŞMA

Köpek ve Kedilerde konjenital ve sekonder triküspit kapak anomalileri nadir olarak bildirilmektedir (Tidholm 1997, Sousa ve ark. 2006, Paslawska ve ark. 2013). Triküspit kapak displazisi insidansı köpeklerde meydana gelen tüm konjenital kalp defektlerinin %7-7.5'ünü oluşturur (Tidholm 1997). Büyük ve saf ırk köpekler, özellikle Labrador Retriever, Boxer, Alman Çoban Köpeği ve Mastiffler en çok etkilenen ırklardır (Paslawska ve ark. 2013, Neetu ve ark. 2017). Sunulan olgu materyalini de, benzer olarak, bir Fransız Mastiff köpek oluşturdu.

Sağ kalp yetmezliğinde asites, pleural efüzyon, halsizlik, uyuşukluk, juguler ven nabızı ve hepatomegali gözlemlenmektedir (Tidholm 1997, Mac Donald ve Jonson 2005, Sousa ve ark. 2006,

Paslawska ve ark. 2013, Neetu ve ark. 2017). Sunulan olgu sağ kalp yetmezliğinin tüm bulgularını içermektedir. Ebstein anomalili hastalarda radyolojik olarak total kalp silüetinde büyüme, sağ atrial dilatasyon ve asites birçok vakada bildirilmiştir. Sunulan vaka raporunda da elde edilen radyolojik bulgular diğer vakalar ile uyumludur. Şilotoraks tanısı bir Golden Retriever'da bildirilmiştir. Sunulan vakada da, torakosentezde alınan numunede şilotorakstan şüphelenilmiş ve Total Kolesterol ve Trigliserid ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş, TC/TG  $\leq 1$  olarak hesaplanmış ve diğer vaka ile paralel olarak hastamıza şilotoraks tanısı konmuştur (Yılmaz ve ark. 2015).

Ekokardiyografi Ebstein anomalinin tanısı için en önemli araçtır (Choi ve ark. 2009). Ebstein anomalili bildirilen vakaların hepsinde ortak olarak,

ekokardiyografide en önemli bulgu; triküspit kapak yaprakçıklarının mitral yaprakçıklara göre daha apekse yerleşmiş olması, sağ atrial aşırı doluma bağlı olarak gelişen sağ atrial dilatasyon ve orta veya şiddetli triküspit yetmezliktir (Eyster ve ark. 1977, Cave 2001, Takemura ve ark. 2003, Deprest ve ark. 2006, Narin 2008, Choi ve ark. 2009, Yılmaz ve ark. 2015, Neetu 2017). Sunulan vakada, gerçekleştirilen ekokardiyografik muayenede triküspit kapağın anormal yerleşimi, sağ atrial dilatasyon ve triküspital kaçak akım tespit edildi.

Ebstein anomalide insanlarda medikal ve yanı sıra cerrahi sağaltım uygulanabilmektedir. Ancak Veteriner Hekimlikte, genel olarak, medikal sağaltım tercih edilmektedir. Cerrahi sağaltım bugüne kadar rapor edilmemiştir. Bu bağlamda; sağ atriyumdaki aşırı yükü azaltmak için ilk olarak diüretikler (furosemid) ve ACE inhibitörleri (enalapril) sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanında pozitif inotropik ilaçlara da (digoxin) tedavide yer verilir (Eyster ve ark. 1977, Cave 2001, Takemura ve ark. 2003, Deprest ve ark. 2006, Narin 2008, Choi ve ark. 2009, Yılmaz ve ark. 2015, Neetu ve ark. 2017). Diüretiklerin ve ACE inhibitörlerinin kalp yükünü ve pleural boşluktaki sıvı hacmini azaltarak kalp fonksiyonunu iyileştirdiği bilinmektedir (Neetu ve ark. 2017). Uygulanan yoğun medikal tedaviye rağmen, bildirilen vakaların tümünde Ebstein anomalili köpeklerin kaybedildiği rapor edilmiştir. Benzer olarak vakamızda da, kullanılan ilaçlar sonrası geçici bir klinik iyileşme olsa da, hasta 8 ay sonra kaybedilmiştir.

Sonuç olarak; sağ kalp yetmezliği bulguları olan köpeklerde Ebstein anomali her zaman göz önünde bulundurulmalıdır. Ebstein anomali, sahip olduğu tipik ekokardiyografik bulgular nedeniyle "uzman" bir kardiyolog tarafından kolayca tanınabilir. Ancak çoğu zaman gözden kaçırıldığı da bir gerçektir. Bu nedenle gerçek insidansı daha yüksek olabilir. Öte yandan bu hastalığa sahip köpeklerde hasta sahibi olumsuz prognoz noktasında mutlak bilgilendirilmedir.

## KAYNAKLAR

- Cave, T.** What was your diagnosis? Congenital tricuspid dysplasia with concurrent Ebstein's anomaly. *The Journal of small animal practice.* 2001; 42(6):271-311.
- Choi R, Lee SK, Moon HS, Park IC, Hyun C.** Ebstein's anomaly with an atrial septal defect in a jindo dog. *The Canadian Veterinary Journal.* 2009; 50(4):405.
- Deprest C, French A, Chiers K.** Congenital tricuspid valve malformation with Ebstein's anomaly in a Golden Retriever. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.* 2006; 75:380-384.
- Eyster GE, Anderson L, Evans AT, Chaffee A, Bender G, Johnston J, Blanchard G.** Ebstein's anomaly: a report of 3 cases in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1977; 170(7):709-713.
- Hosseini A, Özkaptan İ, Mutlu O.** Ebstein's Anomaly in a German Shepherd Dog: Case Report. XIII. *Turkish*

*Small Animal Veterinary Association Congress İstanbul* 2018.

- MacDonald KA, Johnson LR.** Pulmonary hypertension and pulmonary thromboembolism. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2005; pp. 1284-1288.
- Narin N.** Ebstein Anomalisi: Tanı, İzlem ve Tedavi. *Türkiye Klinikleri Cardiology-Special Topics.* 2008; 1(5):74-77.
- Neetu S, Kumar US, Rohit T, Singh RS, Arun A.** A Rare Case of Ebstein Anomaly in a French Mastiff Dog. *Cardiovasc Ther.* 2017; 7(2):555-706.
- Pasławska U, Noszczyk-Nowak A, Janiszewski A, Nicpoń J.** Tricuspid dysplasia in dogs. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy.* 2013; 57(1):123-126.
- Sousa MG, Gerardi DG, Alves RO, Camacho AA.** Tricuspid valve dysplasia and Ebstein's anomaly in dogs: case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 2006; 58(5):762-767.
- Takemura N, Machida N, Nakagawa K, Amasaki H, Washizu M, Hirose H.** Ebstein's anomaly in a beagle dog. *Journal of veterinary medical science.* 2003; 65(4):531-533.
- Tidholm A.** Retrospective study of congenital heart defects in 151 dogs. *Journal of Small Animal Practice.* 1997; 38(3):94-98
- Yılmaz Z, Levent P, Kocatürk M, CIHAN H, Pars E, Saim SAĞ.** Chylothorax associated with Ebstein's anomaly in a Golden Retriever dog. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2015; 62(3):243-246.



## Instruction for Authors

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Discussion:** Results of the study should be discussed with directly relevant references. This section may also be divided into subsections.

**Conclusions:** This section should state clearly the main conclusions of the research. Results should not be repeated.

**Acknowledgements**, it is advised to acknowledge persons or institutions directly or indirectly involved in the study.

### References

References in the text should be made as follows: **Kara (2012)** described. / . was reported (**Zemheri 2015, Eryavuz and Yeni, Eryavuz et al. 2015**). List of references should be given alphabetically in the reference list. Different publications having the same author(s) of same year should be written as **2011a, 2011b**. Web address should be referenced as **anonim** for example **Anonim 2015**. Only official web pages should be used. Author name(s) and date should be written bold. The reference list at the end of the paper should be written as below.

**Journal:**

**Ince S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fidan AF, Eryavuz A.** The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2010; 24(3):161-164.

**Book section:**

**Juneja R, Koide SS.** Molecular Biology of Reproduction, In: *Reproduction in Farm Animals*, Ed; HafezB, Hafez ESE, 7<sup>th</sup> Ed., LippincottWilliams and Wilkins, Philadelphia, USA. 2000; pp. 354-361.

**Web page:**

**Anonymous.** [http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb\\_id=46&cust\\_id=13](http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&cust_id=13);Accessien date: 02.01.2012.

**Thesis:**

**Yeni D.** Some andrological parameters and biochemical properties in relation to season in rams. PhD thesis, Afyon Kocatepe University Health Science Institute, Afyonkarahisar, 2010.

**Tables:** Tables should be presented in a separate page at the end of manuscript.

**Graphics:** Figures should be presented in a separate page at the end of manuscript.

**Figures :** Figures should be presented in a separate page at the end of manuscript. Figures should be 80 or 160 mm, minimum 300 dpi.

**Titles of tables, graphics and figures should be both Turkish and English.**

**Brief Communications:** Brief communications should be concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later publication. They should not exceed 1600 words. They should bear no more than two tables or figures. An ABSTRACT should be given but no other sections. Typescripts should be clearly marked Brief Communication.

**Review Articles:** Review articles related to all medical topics are welcome for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians or clinicians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4500 words. It should have a precise abstract. Author of review should have at least two citations. For each issue maximum 2 reviews are published.

**Case Reports:** Reports of SINGLE or small numbers of cases will be considered for publication in KVJ if the case(s) are particularly unusual/rare or the report contributes materially to the literature. A case report should not exceed 1500 words and must comprise a Summary (maximum 150 words), Introduction, Case History and Discussion. The report should accomplish one of the followings:

- To be a substantially novel presentation
- To be a technique or treatment that would substantially alter management and prognosis of the described condition
- The first clinical report or first case(s) of diseases in a particular location where epidemiology is an important factor
- To exemplify best practice in medical science.

**Letters to The Editor:** Letters describing case reports or original material may be published in the KVJ and will be peer-reviewed prior to publication. Letters making criticisms on recently published papers in the KVJ will also be considered and the corresponding authors of the original paper will be invited to respond accordingly.

**All articles sent to KVJ (Kocatepe Veterinary Journal) ONLINE submission only.**

**During submission documents which are listed below, have to install to the system;**

1. **Title Page:** Author and institution names
2. **Main text:** Author and institution names should NOT be. Tables(s), graphic(s) and figure(s) etc. Should be on the last page of article, also title of them both in Turkish and English.
3. **Article addition:** Table(s), graphic(s) and figure(s) should have been installed to the system separately.
4. **Author Approval Form (Cover Letter):** All authors need to sign it and install to the system. Signatures should be wet signatures and send to the Editorial Board of Kocatepe Veterinary Journal.
5. **Copyright:** All authors need to sign it and install to the system. Signatures should be wet signatures and send to the Editorial Board of Kocatepe Veterinary Journal.