

VFD

MAKÜ

NİSAN/APRIL 2020 CİLT/VOLUME 5 SAYI/ISSUE 1

MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ
DERGİSİ

VETERINARY JOURNAL OF
MEHMET AKİF ERSOY UNIVERSITY

ISSN: 2458-9268
E-ISSN: 2148-6239



VFD

MAKÜ

NİSAN/APRIL 2020 CİLT/VOLUME 5 SAYI/ISSUE 1

MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
**VETERİNER FAKÜLTESİ
DERGİSİ**

**VETERINARY JOURNAL OF
MEHMET AKIF ERSOY UNIVERSITY**

ISSN: 2458-9268
E-ISSN: 2148-6239

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

Cilt / Volume: 05 . Sayı / Number: 01 . 2020

Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University

Altı ayda bir yayımlanır / Published six monthly

E-ISSN 2148-6239

İmtiyaz Sahibi

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Adına

Prof. Dr. Adem KORKMAZ

Rektör

Editörler Kurulu / Editorial Board

Baş Editör / Editor-in Chief

Prof. Dr. Hakan ÖNER

Editör Yardımcıları / Associate Editors

Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ

Doç. Dr. Ahmet AYDOĞAN

Dr. Öğr. Üyesi Halil YALÇIN

Dr. Öğr. Üyesi Ömer Gürkan DİLEK

Dr. Öğr. Üyesi Özlem ŞAHAN YAPICIER

Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Cumhuri AKIN

Dr. Öğr. Üyesi Hidayet TUTUN

Dr. Öğr. Üyesi Hasbi Sait SALTİK

Sekreteryaya / Secretary

Dr. Öğr. Üyesi Özlem ŞAHAN YAPICIER

Araş. Gör. Harun ÇINAR

Öğr. Gör. Leyla Elif Özgü AYÖZGER

Redaktör / Redactor

Dr. Öğr. Üyesi Halil YALÇIN

Mizanpaj, Sayfa Tasarımı ve Dizgi /

Layout, Page Design and Composition

Dr. Öğr. Üyesi Onur KÖSE

Dr. Öğr. Üyesi Hasbi Sait SALTİK

Tel: 0248 213 2000/2010

Yönetim Yeri

Adres / Address

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Veteriner Fakültesi Dekanlığı

İstiklal Yerleşkesi 15030 BURDUR

Yayın Kurulu / Publication Board*

ADANIR Ramazan, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

BALKEVICIUS Mikas, NGO – Problem Based of Learning Institute

BÜYÜKOĞLU Tülay, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

CENGİZ Seyda, Atatürk Üniversitesi

ÇETİN Yunus, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

ÇINAR Harun, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

DIMITROV Rosen, Trakia University

DURO Sokol, Agricultural University of Tirana

KARAKURUM Mehmet Çağrı, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

KART Asım, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

KÖSE Onur, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

MAMAK Nuri, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

MIGALA- WARCHOL Aldona, University of Technology

OĞUZ Mustafa Numan, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

OTROCKA - DOMAGAŁA Iwona, University of Warmia and Mazury

ÖZGEL Özcan, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

ÖZMEN Özlem, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

ÖZSOY Şule Yurdağül, Mustafa Kemal Üniversitesi

STAMATOVA-YOVCHEVA Kamelia, Trakia University

TAŞCI Fulya, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

URAL Kerem, Adnan Menderes Üniversitesi

YİĞİTARSLAN Kürşat, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Bu dergi Uluslararası DOAJ, CAB Abstract, CiteFactor, Google Scholar, Science Library Index, International Institute of Organized Research, Researchbib, SciLit, SJIFactor, COSMOS IF ve SOBIAD indeksleri tarafından taranmaktadır.

This Journal is indexed and abstracted by DOAJ, CAB Abstract, CiteFactor, Google Scholar, Science Library Index, International Institute of Organized Research, Researchbib, SciLit, SJIFactor, COSMOS IF and SOBIAD.

Tüm hakları saklıdır. Bu Derginin tamamı ya da Dergide yer alan bilimsel çalışmaların bir kısmı ya da tamamı Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı'nın yazılı izni olmaksızın elektronik, mekanik, fotokopi ya da herhangi bir kayıt sistemiyle çoğaltılamaz, yayımlanamaz.

E-posta: veterinerdergi@mehmetakif.edu.tr

Web Adresi: <https://edergi.mehmetakif.edu.tr/index.php/vfd>

Online Makale Gönderme (Online Submission)

<http://dergipark.gov.tr/journal/779/dash-board>

Dergimizde yayımlanan makaleler, "iThenticate & Turnitin intihal analiz programı" kullanılarak incelemeye tabi tutulmaktadır.

MAE Vet Fak Derg, 2020, 5 (1) Sayısının Hakem Listesi*

[The referee names of Vet J MAEU, 2020, 5 (1)]

ACAR Abuzer, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi*

ACARÖZ Ulaş, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi*

BAKİ ACAR Duygu, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi*

DİKİCİ Abdullah, *Uşak Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Teknolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi*

EŞKİ Funda, *Çukurova Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi*

İNCİLİ Gökhan Kürşad, *Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Öğretim Elemanı*

KARATEPE Pınar, *Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi*

ÖZBEK Mehmet, *Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi*

SALAR Seçkin, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Öğretim Elemanı*

ŞAHİN Seyda, *Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi*

ŞİMŞEK Azim, *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü Öğretim Üyesi*

YASA DURU Sibel, *Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi*

YILDIZ Mustafa, *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çan Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu İş Sağlığı ve Güvenliği Bölümü Öğretim Üyesi*

*2020 yılı 5.Cilt, 1. sayısında bulunan yayın kurulu üyeleri ve görev alan hakemler alfabetik sıraya göre dizilmiştir.

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Araştırma Makalesi / Research Articles

Taze suşi örneklerinde mikrobiyolojik kalitenin değerlendirilmesi / Evaluation of microbiological quality in fresh sushi samples

YALÇIN H, ÇAKMAK T.....1-5

Geleneksel ve fabrikasyon yöntemlerle üretilmiş isot baharatı ve salçası kullanılarak hazırlanan lahmacunların duyuşsal ve mikrobiyolojik yönden karşılaştırılması / Sensorial and microbiological comparison of lahmacun produced by traditional and packaged isot (pepper) spices and paste

KILIÇ ALTUN S, AYDEMİR ME, DURMAZ H.....6-10

The effect of Calcitriol 1,25 (OH)₂ - D₃ on osteoblast-like cell proliferation during in vitro cultivation

KATICA M, TEPEKÖY F.....11-17

Piyasada satılan surimilerin mikrobiyolojik kalitesinin incelenmesi / Investigation of microbiological quality of surimi sold in the market

YALÇIN H.....18-22

Olgu Sunumu / Case Report

Bir köpekte gebeliği sonlandırmak için kullanılan Aglepriston (RU 46534), sonraki östrus sikluslarını ve meme bezi büyümesini etkiler mi / Does Aglepriston (RU 46534) used to end pregnancy in a dog affect subsequent estrus cycles and mammary gland enlargement?

AKKUŞ T.....23-27

Derleme / Review

Etiological treatment of protozoer diarrhea in neonatal ruminants

AKINCI İY, ALBAY MK.....28-33

Evaluation of microbiological quality in fresh sushi samples

Halil YALÇIN¹, Tuncer ÇAKMAK²

¹Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Burdur/TURKEY

²Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Van/TURKEY

Key Words:

food hygiene
public health
microbiological quality
sushi

Anahtar Kelimeler:

gıda hijyeni
halk sağlığı
mikrobiyolojik kalite
suşi

Received: 27.01.2020

Accepted: 05.03.2020

Published Online: 30.04.2020

Article Code:680767

Correspondence:

T. ÇAKMAK

(tuncercakmak@yyu.edu.tr)

ORCID:

H. YALÇIN: 0000-0003-2162-2418

T. ÇAKMAK: 0000-0002-9236-8958

ABSTRACT

In this study, it is aimed to determine the microbiological quality of 60 different raw salmon finger sushi (maki rolls) samples randomly supplied from consumption points (sushi bar, sushi buffet, hotel, restaurant etc.) serving fresh sushi. The counts of *Escherichia coli*, coagulase-positive *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parabeamolyticus* and *Salmonella* spp. presence (+/-) were examined in these samples for the detection of hygienic quality and pathogenic microorganisms. Twenty-nine of 29/60 (48.3%) samples were found to be positive for these microorganisms. *Salmonella* spp. presence was detected in 2/60 samples (3.3%) while coagulase-positive *S. aureus* was found in 10/60 samples (16.7%) with the highest level of 4.84 log CFU/g. *E. coli* was detected in 15/60 samples (25.0%), *V. parabeamolyticus* was determined in 13/60 samples (21.7%) with a level of 2.90 log CFU/g and 2.82 log CFU/g, respectively. Based on the current findings, it is considered that microorganisms determined in the samples pose a risk to public health, authorities should mandate to conduct routine inspections more frequently and businesses selling sushi should be included in the annual sampling plan. It will be beneficial for healthy sushi production that it should be paid attention to hygienic production during the all manufacturing, storage and service stages and points of sale and relevant staff should be ensured to routinely receive necessary food safety training to minimize the risk of foodborne disease outbreaks.

Taze suşi örneklerinde mikrobiyolojik kalitenin değerlendirilmesi

ÖZ

Bu çalışmada; taze suşi servisi yapan rastgele seçilmiş tüketim noktalarından (sushi bar, sushi büfe, otel, restoran vs.) temin edilen toplamda 60 adet çeşitli çığ somon parmak suşi (maki rolls) örneklerinin mikrobiyolojik kalitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Örneklerde hijyenik kalitenin ve patojen mikroorganizmaların tespit edilmesine yönelik *Escherichia coli*, koagulaz pozitif *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parabeamolyticus* sayıları ile *Salmonella* spp. (+/-) varlığı araştırılmıştır. İncelenen mikroorganizmalar yönünden 29/60 (%48,3) örneğin pozitif olduğu görülmüştür. 2/60 örnekte (%3,3) *Salmonella* spp. varlığı tespit edilirken, koagulaz pozitif *S. aureus*'ün 10/60 (%16,7) örnekte ve en yüksek 4.84 log KOB/g, *E. coli*'nin 15/60 (%25,0) örnekte ve *V. parabeamolyticus*'ün 13/60 örnekte (%21,7) sırasıyla ortalama 2.90 log KOB/g ile 2.82 log KOB/g olduğu saptanmıştır. Mevcut bulgulara dayanarak, örneklerde tespit edilen mikroorganizmaların halk sağlığı açısından riskler taşıdığı, yetkili otoritelerin daha sık rutin denetimler yapması ve suşi satışı yapan işletmelerin yıllık numune planına dahil edilmesi gerektiği düşünülmektedir. Gıda kaynaklı hastalık salgınları riskini en aza indirmek için suşi üretim ve satış yerlerinde tüm üretim, muhafaza ve servis aşamalarında hijyenik üretime önem verilmesi ve ilgili personellerin rutin olarak gerekli gıda güvenliği eğitimini almalarının sağlanması sağlıklı suşi üretimi açısından faydalı olacaktır.

INTRODUCTION

Sushi is a traditional Japanese food, consisting of raw or cooked seafood in combination with eggs, vegetables and cold cooked rice prepared with vinegar and condiments that is shaped into bite-sized pieces, formed into a roll and often wrapped in seaweed (nori) (1, 2). Sushi is known to be a method to preserve fish in Southeast Asia in previous years (3). With its low-fat content, intense nutrients and delicious to consume, sushi, which is rich in high-quality protein and an excellent source of omega-3 fatty acids, is a popular product consumed all over the world. It has become a popular food particularly in our country in the past 15 years and adopted by a wide population (4). The high level of diversity in raw materials

is based on manufacturer choices and local preferences. It is prepared with raw farmed salmon, tuna, and halibut, whiting, cooked scampi, large freshwater prawns, and raw vegetables such as cucumber, spring onion (scallions), and avocado (5, 6). It is a popular ready-to-eat (RTE) food preferred by consumers and offered cold at 4 °C with a sell-by date of 2 to 3 days after production which is served directly to human consumption without cooking or other processes to eliminate or reduce microorganisms to an acceptable level by manufacturers or businesses (6). Intrinsic factors (high water activity, near-neutral pH) of fish meat and raw fish products provide a favorable condition for microorganisms to develop and can cause spoilage within the whole process from the moment of catching of fish to consume in the presence of extrinsic

factors (harvest, hunting, transportation, process, storage etc.) (7). It carries some potential health hazards due to possible contamination of pathogenic microorganisms during raw material, process and storage. Monitoring of microbiological quality is also important to prevent food poisoning cases (3, 6, 8, 9). Sushi is consumed similar to other fast foods without additional heat treatment to reduce microbial load. Therefore, forms of raw seafood products prepared in homes, restaurants and sushi bars should be consumed in a shorter time than industrially prepared products (1). Several factors have been stated to be effective in a large number of food poisoning cases reported in relation to sushi consumption (10, 11). The fact that other foodstuffs used in making sushi are prepared in advance for quick service and possible contaminations of hands and other tools and equipment during the process may lead to an increase in the incidence of potential foodborne pathogens (2). Due to the reasons such as fish and other seafood products used in the preparation of the product, other mixtures such as vegetables and rice and also being consumed raw, hygiene of raw material and business, possible presence of pathogenic microorganisms (*Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*), parasites (Anisakiasis etc.) and viruses (Norovirus) can cause health problems (1, 6, 12, 13). Considering the growing popularity of sushi and other raw seafood dishes especially worldwide, it would be beneficial to raise awareness about the safety of raw seafood products consumption.

In the present study, it was aimed to determine the hygiene level of the products at the consumption points serving fresh sushi (sushi bar, sushi buffet, hotel, restaurant etc.) in Antalya, to evaluate the microbiological quality and preparation conditions and to determine preventive measures to increase food safety in order to provide information about the possible health risks associated with the increased consumption of ready-to-eat sushi.

For this purpose, the samples were examined for *E. coli* as hygiene indicator microorganism, specific food-borne pathogens by the numbers of coagulase-positive *S. aureus* and *V. parahaemolyticus* and presence of *Salmonella* spp.

MATERIAL AND METHOD

Sampling and preparation for analysis

Between June–July 2017, 60 samples of sushi (N=60) obtained from the consumption points serving fresh sushi (sushi bar, sushi buffet, hotel, restaurant etc.) in the province of Antalya on different days were used in this research study. Sushi samples taken into sterile containers under aseptic conditions were placed in polyethylene styrofoam boxes (2-4 °C) containing ice and were delivered to the laboratory in a short time. Sample size and weight were determined as 5.00±0.88 cm and 21.00±1.74 g, respectively. Microbiological analyses were carried out with two replications.

Microbiological analyses

Twenty-five g sample was homogenized in 225 ml MRD (Maximum Recovery Diluent, MRD-Oxoid CM0733, UK) and aliquots of 0.5 ml of prepared dilution were spread-plated onto Chromocult TBX Agar (Oxoid CM0945, UK). Plates were first incubated at 30±1 °C for 4±1h, then at 44±1 °C for 18±2h and growing blue-green colonies were determined as *Escherichia coli*. No confirmation has been made since chromogenic medium was used. The strain *E. coli* ATCC 25922 (ATCC® 25922™, USA) was used as a positive control (14).

Five g sample was homogenized with 45 ml MRD for

coagulase-positive *Staphylococcus aureus* (CFU/g) count, aliquots of 0.4-0.3-0.3 ml of this dilution (a total of 1 ml) by adding 5% Egg Yolk Tellurite (Becton-Dickinson, BBL-212357, USA) were spread-plate onto previously prepared Baird Parker Medium Agar (Oxoid CM0275, UK). The plates were incubated at 35±1 °C for 48h. At the end of the incubation, black-gray shiny colonies with a diameter of 2-3 mm, surrounded by round, convex, smooth, narrow, bright zoned area in plates are considered as possible *S. aureus* colonies and all developing typical colonies were counted. Confirmation of typical colonies was performed by Staphylase (Staphylase Test Kit, Oxoid DR0595, UK) test. Colonies forming a visible agglutination were considered as coagulase-positive *S. aureus*. If the coagulase (staphylase) test result is positive, the number of *S. aureus* was determined as CFU/g by multiplying the counted colonies by the dilution coefficient. The strain *S. aureus* ATCC 25923 (ATCC® 25923™, USA) was used as a positive control (15).

Twenty-five g sample was homogenized with 225 ml alkaline peptone water (APW, Merck 101800, Germany) (containing 3% NaCl), incubated at 35-37 °C for 18-24h for *Vibrio parahaemolyticus* count. The content taken from the upper part of this enrichment medium using a loop without shaking was spread-plate onto Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose Agar (TCBS, Hardy Diagnostics, USA) (containing 3% NaCl) and incubated at 35-37 °C for 18-24h. Round colonies with a diameter of 2-3 mm and green-blue in the middle were evaluated as *V. parahaemolyticus* and confirmation of typical colonies was performed by catalase, oxidase test and API® 20E (BioMerieux, France) biochemical reagent kit (16).

Twenty-five g sample was taken into 225 ml buffered peptone water for *Salmonella* spp. identification and was incubated at 37±1 °C for 16-20h. After incubation, 1 ml of this suspension was transferred into 10 ml of Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth (MKTTn-Oxoid CM1048, UK) for selective enrichment. Tubes were incubated at 37±1 °C for 6-8h. Concordantly, 10 ml of pre-enrichment suspension were transferred into Rappaport Vassiliadis Soy Broth (RVS-Oxoid CM0886, UK) and incubated at 41.5±1 °C for 6-8h. Aliquots of these secondary enrichment broth were then spread-plate onto Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD-Oxoid CM0469, UK) and Brilliant Green Agar-Modified Agar (BGA-Oxoid CM0329, UK) using a loop and typical colonies were examined. Positive *Salmonella* spp. samples with typical colonies were confirmed using a Vidas device (mini VIDAS®, BioMerieux, France) (17).

RESULTS

Numbers of *E. coli*, coagulase-positive *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* of 60 analyzed sushi samples were calculated using base-10 logarithms and given as log CFU/g in Table 1. *Salmonella* spp. is presented as absent/present in Table 1.

DISCUSSION

RTE sushi is considered a kind of potentially hazardous food because it contains perishable ingredients. If it is not prepared in a hygienic procedure and stored at low temperature, it may cause food poisoning (2). It is recommended by ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) that food containing seafood products should be kept at temperatures below or close to 5 °C (8). *E. coli* count in food products, which have been used to indicate direct or indirect fecal contamination, is a method used to indicate the cleanliness in food handling as well as the appropriateness of storage condition (2, 11). According to our study results, *E. coli* number was found to be ranging from ND (not detected the bacteria) and 3.96 log CFU/g in 15/60 samples (25%) and 2.90 log CFU/g on average, and 75% of the samples were

Table 1 Microorganisms analyzed in sushi samples and their numbers (N=60)

Number of microorganisms (log CFU/g)	Indicator and Pathogen Microorganisms Levels (sample-%)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (coagulase positive)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Salmonella</i> spp. (+/-)
ND	0.0 (75.0%)	0.0 (83.3%)	0.0 (78.3%)	58.0 (96.7%)
1.00<2.00	ND	ND	ND	
2.00<3.00	9.0 (15.0%)	4.0 (6.7%)	9.0 (15.0%)	
3.00<4.00	6.0 (10.0%)	5.0 (8.3%)	4.0 (6.7%)	2.0 (3.3%)
4.00<5.00	ND	1.0 (1.7%)	ND	
5.00≥	ND	ND	ND	
Min.	ND	ND	ND	-
Max.	3.96	4.84	3.86	-
Means	2.90	3.24	2.82	-
TOTAL	15.0(25.0%)	10.0(16.7%)	13.0(21.7%)	2.0 (3.3%)

CFU: Colony Forming Unit, N: Number of samples, ND: Not Detected

found to be negative for this microorganism (Table 1). The recommended limit for good quality foods (2.7 log CFU/g) was exceeded in 9 samples for *E. coli* (18). It is considered that this situation results from possible contamination due to poor hygiene and sanitation in operation, personnel or equipment during production and preservation in businesses, raw material and other reasons (production line design, water, etc.).

Staphylococcus aureus is a microorganism with variable virulence and produces toxin when it is exceeded the level of 5 log CFU/g. Toxin dose of less than 1.0 µg may produce symptoms of intoxication (19). Although *S. aureus* is not part of the normal fish microflora, it is reported that it is possible to have contamination arising from nutrients involved in fish products prepared with personnel and/or other foods during the process (2, 11). In this study, coagulase-positive *S. aureus* was detected ranging from ND and 4.84 log CFU/g in 10/60 samples (16.7%) (Table 1).

According to the results, the presence of a sample with a potential to produce toxin indicates that proper personnel hygiene and other cleaning procedures are disrupted where the relevant sample is provided. *S. aureus* contamination denotes a lack of good hygienic practices by businesses, spoilage after harvest due to diseases in fish used in the preparation of raw materials or sushi or the possibility of cross contamination during raw material and/or process stages (11, 20).

Vibrio parahaemolyticus is a microorganism that is more common in the hot summer months and naturally found in marine environments and constitutes an average of 30% of the total microbial load in seawater. The primary control measure is mostly intended to prevent the proliferation of this organism (8, 21). In our country, there is a legal regulation for the absence of this microorganism in frozen and processed fish products (22). According to our study results, *V. parahaemolyticus* presence was detected in the level of 2.82 log CFU/g on average in 13/60 samples (21.7%), and it was found to be noncompliance with the relevant regulation (Table 1).

Salmonella spp. is a pathogen bacterium causes food poisoning and infection, and it is reported that even <10 CFU *Salmonella* spp. organisms may lead to infection (2). Possible contamination of *Salmonella* spp. in raw materials, food

manufacturing, tools and equipment used in the food chain, processing and retailing stages can cause very important health problems for public health. In general, all raw foods including fish, shellfish, fruits, vegetables, poultry, eggs, other foods of animal origin, dairy products and crops are always at risk for non-typhoid *Salmonella* spp. (23). Although there is a close relationship between RTE food consumption and *Salmonellosis*, previous studies have reported that the presence of *Salmonella* spp. in sushi is not very common in general (9). Although outbreaks related to *Salmonella* spp. infected fishery products (fish borne) is not very common, it has been reported that after sushi consumption, 62 people in 11 different locations in The United States of America experienced food poisoning and diagnosed with *Salmonellosis*. In our country, there is no RTE food definition and no legal regulation has been published specifically for these foods. Turkish Food Codex (TFC) (24) and Regulation on Seafood (22) report that *Salmonella* spp. should not be present (0/25 g-ml) in fishery products and processed or frozen fish products. The amount of *Salmonella* spp. in RTE foods has been determined as 0/25 g by the European Commission (25). According to our study results, 2/60 samples (3.3%) were found to be noncompliance with the relevant regulations (Table 1).

A study examining sushi samples taken in winter (December-February) demonstrated that positive sample counts were determined as 11/447 (2.5%) for *E. coli* and 7/447 (16%) for coagulase-positive *staphylococci* while *Salmonella* spp. (0/447) and *V. parahaemolyticus* (0/155) were not detected. In samples taken in summer (June-August), *V. parahaemolyticus* was detected in 1/158 sample, examined samples were negative for *Salmonella*, determined limit was exceeded in 6/404 samples for *E. coli* and 2/404 samples for coagulase-positive *staphylococci* (8). Atanasovva et al. (11) revealed that *E. coli* was detected ranging from 2.0 and 3.3 log CFU/g in 24/125 fresh sushi samples, *Staphylococcus* spp. with high prevalence was detected ranging from 3.8 and 4.7 log CFU/g in all samples and the prevalence was high (125/125), *Salmonella* spp. was found in 1/125 (0.8%) sample and *Vibrio* spp. were not detected in any sample. In several studies, it is shown that *V. parahaemolyticus* contamination in samples may originate from fishery and shellfish products used in the preparation of sushi, *Salmonella* spp. and *S. aureus* contamination may be caused by vegetables, mayonnaise containing raw egg and personnel-related (3, 8).

In 38 samples obtained from consumption points such as restaurant, sushi bar, *Salmonella* spp. and *V. parahaemolyticus* were not found, coagulase-positive *staphylococci* was detected ranging from 2.00 and 3.60 log CFU/g in 16/38 samples (42.11%) and found at an unacceptable level in 6 samples (3). Liang et al. (2) reported in packaged sushi samples taken from 120 different consumption points that *E. coli* and *S. aureus* counts were 1.0 and 2.3 log CFU/g on average, respectively and *Salmonella* spp. was not detected in any samples. Wong and Cheung (21) indicated that the number of *E. coli* was found as 20/102 (19.6%) in 102 fresh sushi samples, *V. parahaemolyticus* was detected in only 3/102 samples (2.9%), the presence of *E. coli* and *V. parahaemolyticus* results from inadequate hygiene practices in pre-harvest, harvest and sushi processing stages and possible bacterial contamination in fishery and other aquaculture products. Coagulase-positive *staphylococci*, *V. parahaemolyticus* and *Salmonella* spp. could not be detected in 36 samples taken from several restaurants, whereas positive *E. coli* count was found as 2/36 (5.6%) (7). *Salmonella* spp. was not detected in 28 sushi samples obtained from 7 different businesses whereas *E. coli* was found in 3.6% of samples (9). *E. coli* was detected in 38/50 fresh sushi samples taken from sushi bars and *S. aureus* were found in 11/50 samples (26). *Staphylococcus* spp. was determined ranging from 3.3 and 3.8 log CFU/g in samples obtained from 20 different retail points serving sushi, *S. aureus* count was found less than 2 log CFU/g on average (27).

According to the study results, it is considered that different findings may proceed from microbial contaminations to be occurred pre-harvest during and post-harvest in fishery and other seafood products used in making sushi (21), operational and personnel hygiene during the entire process, possible contaminations during preservation of final product sushi and other raw materials and deficiencies in cold storage applications.

CONCLUSION

In order to maintain the quality of food products, they must be kept at low temperatures. United States Food and Drug Administration (FDA) that in order to eliminate the possible parasite presence in raw seafood used in sushi, it is necessary to wait for 7 days below -20 °C or for 15h below -35 °C. According to EC (28) and TFC (24), in order to kill other parasites other than Trematodes in fishery products to be consumed raw, freezing process should be applied not less than 24h at -20 °C or less than 15h at -35 °C, and there is a regulation to preserve fresh fishery products at a temperature close to melting point. Due to the high potential of food poisoning of raw seafood products, they should be transported under temperature control in order to reduce microbial development and should be kept at ≤5 °C until the process in the businesses (21). It is initially necessary to choose suitable raw materials for microbial quality to make a healthy sushi. It should be taken into consideration that sushi rice is not a good substrate for microbiological development because of its low pH (<4.6), however; it might contribute to inhibiting the development of lactic acid bacteria since it contains fermented carbohydrates (1, 4, 6). As sushi is highly sensitive to deviations from optimal storage temperature, positive correlations between microorganism counts and storage temperatures may lead to loss of quality during sell-by date (29). Careful selection of other nutrients used in making sushi, maintenance of cold chain during preparation processes and storage, compliance with hygiene and sanitation rules in personnel, equipment and service (3, 11) should be adopted as the basic principles in order to maintain the microbiological quality in the final product. In addition, businesses ensuring their personnel to receive hygiene training on a regular basis and increased frequency of inspections by authorities will provide a significant contribution to minimize sushi-related

food poisoning. GMP (Good Manufacturing Practice) or HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) food safety control systems incorporating into the manufacturing process by businesses will help strengthen the food safety control. The fact that consumers behave sensitively during transportation and storage of ready-prepared sushi, prefer places making good quality sushi and care about shelf life, people with chronic conditions such as immune system insufficiency, pregnancy and cancer should be more careful about sushi consumption due to their risks will contribute to healthy sushi consumption.

CONFLICTS OF INTEREST

We declare that there are no conflicts of interest among the authors of the article.

REFERENCES

1. Lorentzen G, Breiland MSW, Cooper M, Herland H. Viability of *Listeria monocytogenes* in an experimental model of nigiri sushi of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and salmon (*Salmo salar*). Food Control. 2012;25(1):245-48.
2. Liang WL, Pan YL, Cheng HL, Li TC, Yu PHF, Chan SW. The microbiological quality of take-away raw salmon finger sushi sold in Hong Kong. Food Control. 2016;69:45-50.
3. Muscolino D, Giarratana F, Beninati C, Tornambene A, Panebianco A, Ziino G. Hygienic-sanitary evaluation of sushi and sashimi sold in Messina and Catania, Italy. Ital J Food Saf. 2014;3(2):134-36.
4. Corapci B, Guneri N. Yengeç, istakoz surimi ve fume somon ile hazırlanmış makizusunin 4±1 °C'de duyuşal, kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesi. J Food Health Sci. 2016;2(4):159-70.
5. Mol S, Uçok Alakavuk D, Ulusoy S. Effects of modified atmosphere packaging on some quality attributes of a ready-to-eat salmon sushi. Iran J Fish Sci. 2014;13(2):394-406.
6. Hoel S, Mehli L, Bruheim T, Vadstein O, Jakobsen AN. Assessment of microbiological quality of retail fresh sushi from selected sources in Norway. J Food Prot. 2015;78(5):977-82.
7. Batista CM, Ribeiro MLR, de Souza MJF, Borges LJ, de Castro Ferreira TAP, Andre MCP. Microbiological and physicochemical qualities of sushi and sashimi from Japanese Restaurants in Brazil. J Food Nutr Res. 2017;5(10):729-35.
8. Authority NSW. Report on food handling practices and microbiological quality of sushi in Australia. Sydney, Australia: Author; 2008. p. 1-26.
9. Ramires T, Iglesias MA, Vitola HS, Nuncio ASP, Kroning IS, Kleinubing NR, et al. First report of *Escherichia coli* O157:H7 in ready-to-eat sushi. J Appl Microbiol. 2020;128(1):301-09. <https://doi.org/10.1111/jam.14456>. <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>.
10. Barralet J, Stafford R, Towner C, Smith P. Outbreak of *Salmonella* Singapore associated with eating sushi. Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report. 2004;28(4):527-28.
11. Atanassova V, Reich F, Klein G. Microbiological quality of sushi from sushi bars and retailers. Journal of Food Protection. 2008;71(4): 860-64.

12. Altekruze SF, Cohen ML, Swerdlow DL. Emerging foodborne diseases. *Emerg Infect Dis.* 1997;3(3):285-93.
13. Nawa Y, Hatz C, Blum J. Sushi delights and parasites: the risk of fishborne and foodborne parasitic zoonoses in Asia. *Clinical Infectious Diseases.* 2005;41(9):1297-303.
14. Health Protection Agency. Direct enumeration of *Escherichia coli*, National Standard Method F 20, Issue 1. 2004.
15. Benntt W, Lancette GA. Bacteriological Analytical Manual (Chapter 12): *Staphylococcus aureus*. Department of Health and Human Services, 8th ed. US Food and Drug Administration; 2001.
16. Kaysner CA, DePaola AJ. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 9, *Vibrio*. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManual/ucm070830>. 2004. Access date: 15/01/2020.
17. ISO P. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Geneva, Switzerland: ISO Norm 6579: 2002.
18. ICMSF 1986. Microorganisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications, 2nd ed. International Commission on Microbiological Specifications for Foods.
19. Food and Drug Administration. Bad bug book: handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. Center for Food Safety and Applied Nutrition; 2012.
20. Austin B, Austin DA. Bacterial Fish Pathogens. Heidelberg: Springer; 2012. p. 652.
21. Wong P, Cheung KT. Prevalence of foodborne pathogen in fresh sushi at sushi take-out stores in Hong Kong. *EC Microbiol.* 2019;15(10):1060-68.
22. Regulation on Seafood. 10.03.1995 Official Journal Number: 22223, Different Official Journal Number: 21.09.2008-27004. 2008.
23. Gomez-Aldapa CA, del Refugio Torres-Vitela M, Villarruel-Lopez A, Castro-Rosas J. The role of foods in *Salmonella* infections. *Salmonella-a dangerous foodborne pathogen*. Mahmoud, BSM. Croatia: Intech Publisher ed. 2012; 21-46.
24. Turkish Food Codex. Regulation of Microbiological Criteria. 29.12.2011/Official Journal Number: 28157. 2011.
25. EC. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union. 2004;L 50:1-26.
26. Abdel-Hakeem SS, Mahmoud GAE, Abdel-Hafeez HH. Evaluation and microanalysis of parasitic and bacterial agents of Egyptian fresh sushi, *salmo salar*. *Microscopy and Microanalysis.* 2019;25(6):1498-508.
27. Li H, Stegger M, Dalsgaard A, Leisner JJ. Bacterial content and characterization of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in Danish sushi products and association with food inspector rankings. *Int J Food Microbiol.* 2019;305:108244. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108244>.
28. EC. Commission Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Official Journal of the European Union. 2004;L 139:30-205.
29. Hoel S, Jakobsen AN, Vadstein O. Effects of storage temperature on bacterial growth rates and community structure in fresh retail sushi. *J Appl Microbiol.* 2017;123(3):698-709.

Geleneksel ve fabrikasyon yöntemlerle üretilmiş isot baharatı ve salçası kullanılarak hazırlanan lahmacunların duyuusal ve mikrobiyolojik yönden karşılaştırılması

Serap KILIÇ ALTUN, Mehmet Emin AYDEMİR, Hisamettin DURMAZ

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Şanlıurfa/TÜRKİYE

Anahtar Kelimeler:

lahmacun
isot baharatı
salça
TMAB
koliform

Key Words:

lahmacun
isot spice

TMAB
koliform

Geliş Tarihi: 10.12.2019
Kabul Tarihi: 25.03.2020
Yayın Tarihi: 30.04.2020
Makale Kodu: 657303

Sorumlu Yazar:
ME. AYDEMİR
(aydemiremin23@gmail.com)

ORCID:
S. KILIÇ ALTUN: 0000-0002-4203-2508
ME. AYDEMİR: 0000-0002-5849-1741
H. DURMAZ: 0000-0002-7761-9843

Bu araştırma 25-26 Ağustos 2019 tarihlerinde Adıyaman Gölbaşı ilçesinde düzenlenen Hoca Ahmet Yesevi Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

ÖZ

Bu çalışmanın amacı geleneksel ve fabrikasyon yöntemlerle üretilmiş isot baharatı ve salçası kullanarak hazırlanan lahmacunların duyuusal ve mikrobiyolojik yönden karşılaştırılmasıdır. Mikrobiyolojik analizlerde; kullanılan çiğ dana kıyması (Ç), Hamur (H), geleneksel ev isot baharatı ve salçası ile hazırlanmış lahmacun harcı (GÇ), fabrikasyon isot baharatı ve salçası ile hazırlanmış lahmacun harcı (FÇ), geleneksel isot baharatı ve salçası ile hazırlanmış pişirilmiş lahmacun (GP) ve fabrikasyon isot baharatı ve salçası ile hazırlanmış pişirilmiş lahmacun (FP) örnekleri materyali oluşturdu. Mikrobiyolojik analizler için; toplam aerob mezofilik bakteri (TMAB) ve koliform grubu bakteri sayımı yapıldı. Duyusal analizler için; lahmacun örneklerinin tat, görünüm, koku ve kıvam açısından 1-5 arasında bir puanlama yapılması istenildi. Mikrobiyolojik analizler sonucunda; Ç, H, GÇ (0. saat), FÇ (0. saat), GÇ (5. saat), FÇ (5. saat), GP, FP örneklerinde ortalama TMAB sayılarının sırasıyla $3,88 \pm 0,60$, $4,50 \pm 0,30$, $6,48 \pm 0,25$, $6,12 \pm 0,25$, $5,60 \pm 0,30$, $5,53 \pm 0,62$, $4,74 \pm 0,31$ ve $4,60 \pm 0,30$ \log_{10} kob/g olduğu, koliform grubu bakteri sayılarının ise sırasıyla $2,68 \pm 0,31$, $1,45 \pm 0,25$, $5,07 \pm 0,50$, $5,00 \pm 0,75$, $4,46 \pm 0,23$, $3,79 \pm 0,23$, $1,39 \pm 0,78$ ve $1,61 \pm 0,79$ \log_{10} kob/g olduğu tespit edildi. Duyusal analizler sonucunda; panelistlerin geleneksel isot baharatı ve salçası ile hazırlanmış lahmacunlara tat, görünüm, koku ve kıvam açısından verdikleri puanların ortalamaları sırasıyla $3,9 \pm 0,16$, $4,3 \pm 0,21$, $3,8 \pm 0,08$ ve $3,8 \pm 0,14$ olarak, fabrikasyon isot baharatı ve salçası ile hazırlanmış lahmacunlarda ise $2,7 \pm 0,13$, $3,3 \pm 0,26$, $2,8 \pm 0,72$ ve $2,8 \pm 0,48$ olarak bulunmuştur. Sonuç olarak kullanılan isot baharatı ve salçasının, geleneksel veya fabrikasyon yöntemiyle üretilmiş olmasının, lahmacunun mikrobiyolojik kalitesi üzerine etki etmediği ancak duyuusal kaliteye ise önemli düzeyde etki ettiği istatistiksel olarak ortaya konulmuştur.

Sensorial and microbiological comparison of lahmacun produced by traditional and packaged isot (pepper) spices and paste

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the sensorial attributes and microbiological quality of lahmacun produced by traditionally-prepared isot spices and paste in comparison with commercial packaged isot spices and paste. Lahmacun samples used for microbiological analysis were: raw ground beef (Ç), dough (H), lahmacun mixture (GÇ) produced by traditional homemade isot spice and paste, lahmacun mixture (FÇ) produced by packaged isot spice and paste, cooked lahmacun (GP) produced by traditional homemade isot spice and paste, baked lahmacun produced by packaged isot spice and paste (FP). For the microbiological analyzes, Plate Count Agar (PCA) was used for total aerobic mesophilic bacteria (TMAB), and Violet Red Bile (VRB) Agar was used for coliform bacteria. For the sensory analyzes, panelists were asked to score lahmacun samples between 1-5 on taste, appearance, smell and texture. Mean TMAB counts in Ç, H, GÇ (0. saat), FÇ (0. saat), GÇ (5. saat), FÇ (5. saat), GP, FP samples, were found as $3,88 \pm 0,60$, $4,50 \pm 0,30$, $6,48 \pm 0,25$, $6,12 \pm 0,25$, $5,60 \pm 0,30$, $5,53 \pm 0,62$, $4,74 \pm 0,31$ and $4,60 \pm 0,30$ \log_{10} cuf/g, respectively. The mean coliform group bacteria counts in Ç, H, GÇ (0. saat), FÇ (0. saat), GÇ (5. saat), FÇ (5. saat), GP, FP samples were found as $2,68 \pm 0,31$, $1,45 \pm 0,25$, $5,07 \pm 0,50$, $5,00 \pm 0,75$, $4,46 \pm 0,23$, $3,79 \pm 0,23$, $1,39 \pm 0,78$ and $1,61 \pm 0,79$ \log_{10} cuf/g. On the sensory analysis, the mean scores for lahmacun made with traditional isot spice and paste in terms of taste, appearance, smell and texture, were found as $3,9 \pm 0,16$, $4,3 \pm 0,21$, $3,8 \pm 0,08$, $3,8 \pm 0,14$, respectively. The average ratings for lahmacun made with packaged isot spice and paste were $2,7 \pm 0,13$, $3,3 \pm 0,26$, $2,8 \pm 0,72$, $2,8 \pm 0,48$, respectively. The results indicate that there was no significant difference in terms of microbiological quality between the traditional homemade and the commercially packaged isot spice and paste used, while significant difference was found for sensorial attributes.

GİRİŞ

Lahmacun; kıyma, maydanoz, soğan, sarımsak, karabiber, tuz ve isot gibi baharatların kullanılarak hazırlanması ve pişirilmesi ile elde edilen bir mamuldür. Lahmacun kelimesi, Arapça'da etli hamur anlamına gelen 'Lahm-i acun'dan (et ve hamur) türemiştir. Türk Pizzası olarak da adlandırılan ve ülkemizde üretimi ve tüketimi oldukça yaygın bir gıda olan lahmacunun tarihi Babillere kadar dayanmaktadır (1).

Biber, Dünya'da yaygın olarak yetiştirilen *Capsicum* cinsinden tek yıllık bir bitkidir. Kırmızıbiber (*Capsicum annum* L.) sahip olduğu renk ve aroması ile domatesten sonra, yaygın üretilen sebzeler arasında ikinci sırada yer almaktadır (2). Kırmızıbiberin üretimi en yaygın sırasıyla Çin, Meksika ve Türkiye'de yapılmaktadır. Türkiye'de üretilen toplam yaş kırmızıbiberin yarısına yakını Şanlıurfa il sınırlarında yetiştirilmektedir (3). Ülkemizdeki en yaygın kullanım biçimi kurutulmuş elde edilen baharat ve salça olan kırmızıbiber, taze ve sos gibi farklı şekillerde de yaygın olarak tüketilebilen bir sebzedir. Genellikle yemeklere çeşni ve renk katmak amacıyla kullanılan kırmızıbiberden üretilen isot baharatı ve salçası, özellikle çiğ köfte ve lahmacun gibi yöresel ürünlerin hazırlanmasında kendine has koyu kırmızı rengi ve aromasından dolayı önemli bir bileşen olarak kullanılmaktadır (5).

İsot baharatı üretimi geleneksel ev yapımı ve fabrika üretimi olmak üzere iki farklı şekilde yapılmaktadır. Geleneksel yöntemlerle evde üretilen isot baharatı, olgunlaşmış taze kırmızıbiberler tohum yuvaları ve sap kısımları ayrılarak elle iki parçaya ayrılıp, güneşte ön kurutma, tuzlayarak torbalarda letirme, güneşte son kurutma ve öğütürerek yağlama şeklinde elde edilmektedir. Fabrika üretimi isot baharatının üretimi daha hızlıdır. Bu üretimde, nem oranı %15'in altına düşüncüye kadar fırınlarda kurutulmuş kırmızıbiber, öğütüleüp önce pul biber ardından tavlama ve kepertme işlemleri ile isota dönüştürülmektedir (3).

Ticari isot biberinden salça üretiminde kırmızı biberler önce yıkanıp parçalandıktan sonra çift cidarlı kazanlarda (85–100 °C) ısıtılmakta, ya da parçalanmadan otaklavda buharla 100 °C'nin üzerinde ön ısıtma uygulanmaktadır. Bu işlemden sonra palperden geçirilerek pulp elde edilmekte ve genellikle evaporatörde konsantre edilmektedir. Daha sonra ambalajlara dolum işlemi yapılarak sterilizasyon uygulanmaktadır. Geleneksel isot salçası üretiminde ise biberler yıkanıp parçalandıktan sonra kıyma makinasından geçirilmekte ve güneşin önünde kıvamını alana kadar bekletilmektedir. Bu bekleme sırasında salçada fermentasyon meydana gelmekte ve böylece daha iyi bir aroma ve görünüm oluşması sağlanmaktadır (4).

Acı biberlerin yapısında antiinflamatuar, antikanserjenik, antihipemik, antioksidan, anti-dispeptik ve antibakteriyel etkisi olan kapsaisin insan sağlığı üzerine birçok olumlu etkisi yapılan araştırmalarla rapor edilmiştir (6). Bu etkilerinin yanı sıra acı biberler gıda sanayinde doğal antimikrobiyal, aroma ve renk katkı maddesi olarak da pek çok alanda kullanılmaktadır (7, 8, 9).

Et ürünlerinde kullanılan baharatların çeşidi kullanılan ürüne, bölgeye ve bölge halkının damak tadına göre değişebilmektedir. Baharatların kendine has aroması yanında ürünün kalitesini iyileştiren antibakteriyel ve antioksidan etkileri de bulunmaktadır (10). Genel olarak et ürünlerinde karabiber, kekik, kırmızı pul biber, kimyon ve acı kırmızıbiber gibi baharatlar kullanılmaktadır. İso baharatı, ülkemizde yaygın olarak kebab, köfte, çiğköfte ve lahmacun gibi kıyma ile yapılan ürünlere katılarak kullanılır. İso gibi baharatlar et ürünlerinde yalnızca aroma vermek için değil aynı zamanda antimikrobiyal etkiyi sağlayan esansiyel yağ içerikleri ile

bozulma riskini azaltmak için de kullanılmaktadır (11, 12).

Geleneksel ve fabrikasyon yöntemlerle üretilmiş isot baharatı ve salçası yapım prosesleri yukarıda bahsedildiği gibi farklı şekildedir. Bu çalışmanın amacı da üretim prosesleri farklı olan isot baharatı ve salçasından hazırlanan lahmacunlar arasında duyuşsal ve mikrobiyolojik açıdan bir fark oluşturup oluşturmadığının araştırılmasıdır

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada materyal olarak; bir grup için geleneksel ev yapımı 10 gr isot baharatı, geleneksel ev yapımı 120 gr isot salçası, 500 gr çiğ dana kıyması, 20 gr maydanoz, 200 gr soğan, 25 gr sarımsak, 5 gr karabiber, 20 gr tuz ve 100 gr ayçiçek yağından oluşan lahmacun harcı karışımı hazırlanmıştır. Diğer grup için aynı miktarda ve oranlarda malzemeler kullanılarak sadece geleneksel ev yapımı isot baharatı ve salçası yerine fabrika üretimi isot baharatı ve salçası kullanılarak lahmacun harcı hazırlanmıştır. Hazırlanan lahmacun harçları isot baharatı ve salçası daha iyi antimikrobiyal özellik göstermesi, aroma ve lezzetin daha iyi karışma geçmesi için 5-6 saat +4 °C'de bekletilmiştir. Bu süre sonunda her lahmacun için 100 gr hamur açılarak üzerine 100 gr lahmacun harcı homojen olacak şekilde koyulmuştur. Daha sonra fırında 200 °C'de 8 dakika süreyle pişirilmiştir. Lahmacun piştiğinde lahmacunun yüzey sıcaklığı 98±2 °C olarak ölçülmüştür. Toplamda 104 lahmacun (52 geleneksel isot ve salçası, 52 fabrikasyon isot ve salçası) pişirilmiştir. Pişirildikten sonra 50 kişiye her gruptan bir lahmacun örneği olacak şekilde duyuşsal analizler için panelistlere tattırılmıştır. Mikrobiyolojik analiz için her grup lahmacundan ikişer tane olacak şekilde toplam dört lahmacun kullanılmıştır. Lahmacun örneğinin tamamından küçük parçalar halinde kesilen her bir örnekten (Ç, H, GÇ, FÇ, GP ve FP) 25'er g tartılarak 225 ml (1:10 dilüsyon oranı) steril %0,1 peptonlu su (Oxoid CM 733R) ile 5 dakika homojenize edilmiş ve aynı çözelti ile 10⁸ seviyesine kadar seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan toplam mezofilik aerobik bakteri, koliform grubu bakteri sayımı için besi yerlerine ekimler yapılmıştır (13).

Toplam Mezofilik Aerob Bakteri (TMAB) Sayımı

TMAB sayımında Plate Count Agar (PCA) (Oxoid, CM0463) kullanılmıştır. Yayma plak yöntemine göre uygun dilüsyonlar petri kutularındaki besi yerlerine ekimi yapılarak, 37 °C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra, bütün koloniler sayılmıştır (14).

Koliform Sayımı

Bu amaçla Violet Red Bile Agara (Oxoid CM107) çift katlı dökme plak yöntemiyle ekim yapıldı. Plaklarda 37±1 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda oluşan menekşe-kırmızı renkli tipik koloniler sayılmıştır (15).

pH Tayini

Dijital pH metre (Selecta - pH 2001) ile ölçümler yapılmıştır.

Duyusal Analizler

Lahmacunların duyuşsal analizleri için, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesinde öğrenimine devam eden 18-25 yaş aralığında, 40 erkek 10 bayan olmak üzere toplam 50 öğrenci panelist olarak belirlenmiştir. Lahmacun örnekleri tat, görünüm, koku ve kıvam açısından 1 ile 5 arasında puanlanmıştır (16).

İstatistiksel Analizler

Mikrobiyolojik analizlerden elde edilen sonuçlar logaritmaya çevrilmiştir. Duyusal analizlerden elde edilen bulgulara Bağımsız T testi yapılmıştır. Mikrobiyolojik analizlerden elde edilen bulgulara Mann Whitney U testi yapılmıştır. İstatistiksel analizlerde SPSS paket programı (21.0. Version) kullanılmıştır (17). Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir.

BULGULAR

Mikrobiyolojik analizler sonucunda toplam aerobik mezofilik bakteri sayıları Ç 3,88±0,60, H 4,50±0,30, GÇ (0. saat) 6,48±0,25, FÇ (0. saat) 6,12±0,25, GÇ (5. saat) 5,60±0,30, FÇ (5. saat) 5,53±0,62, GP 4,74±0,31 ve FP 4,60±0,30, log₁₀ kob/g olduğu, koliform grubu bakteri sayılarının ise Ç 2,68±0,31, H 1,45±0,25, GÇ (0. saat) 5,07±0,50, FÇ (0. saat) 5,00±0,75, GÇ (5. saat) 4,46±0,23, FÇ (5. saat) 3,79±0,23, GP 1,39±0,78 ve FP 1,61±0,79 log kob/g olduğu tespit edildi. Örneklerin mikrobiyolojik analiz sonuçları Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmiştir. Her iki grupta da sıfırıncı saat ile beşinci saat arasında yaklaşık 1 log₁₀'luk bir düşüş görülmüştür. Ayrıca her iki grupta da çiğ ve pişmiş lahmacunlarda TMAB sayısında yaklaşık 2 log₁₀'luk, koliform sayısında ise 3 log₁₀'luk bir düşüş görülmüştür. Ancak geleneksel ve fabrikasyon yöntemlerle üretilmiş isot baharatı ve salçasının, lahmacun yapımında kullanılmasının mikrobiyolojik kalite açısından istatistiksel olarak bir fark oluşturmadığı saptanmıştır (P>0.05).

Ph tayini sonucunda sıfırıncı saate yapılan ölçümlerde GÇ 5,3±0,1, FÇ 5,5±0,2, beşinci saate yapılan ölçümlerde ise GÇ 5,91±0,2, FÇ 5,82±0,4 olarak ölçülmüştür. Gruplar arasında Ph açısından bir fark olmadığı görülmüştür. Ph ölçüm sonuçları Şekil 1. de grafikte verilmiştir.

Duyusal analizler sonucunda; geleneksel ev isot baharatı ve salçası ile hazırlanmış lahmacunların panelistler tarafından tat, görünüm, koku ve kıvam açısından verdikleri puan ortalamaları sırasıyla 3.9±0.16, 4.3±0.21, 3.8±0.08, 3.8±0.14. şeklinde olup, fabrikasyon isot baharatı ve salçası ile hazırlanmış lahmacunların panelistler tarafından tat, görünüm, koku ve kıvam açısından verdikleri puan ortalamaları ise sırasıyla 2.7±0.13, 3.3 ± 0.26, 2.8 ± 0.72, 2.8 ± 0.48 şeklinde olduğu hesaplanmıştır. Geleneksel isot baharatı ve salçası ile hazırlanmış lahmacunların tat, görünüm, koku ve kıvam açısından fabrikasyon isot baharatı ve salçası ile hazırlanmış lahmacundan daha yüksek puan aldığı tespit edilmiştir (P<0.001) Duyusal analizler sonucunda panelistler tarafından verilen puanlamaların ortalamaları Tablo 3 'de verilmiştir.

Tablo 1 Lahmacun örneklerinin toplam aerob mezofilik bakteri sayıları (log kob/g)
Table 1 Total aerob mesophilic bacteria counts of lahmacun samples (log cfu / g)

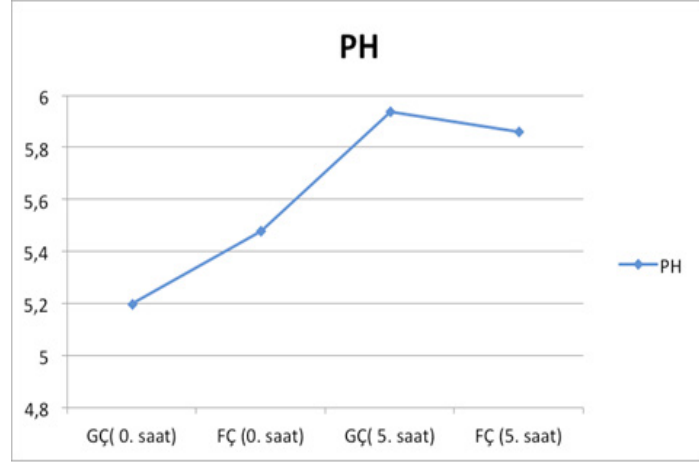
Örnek	n	Minimum	Maximum	Ortalama±SH
Ç	2	3,77	4,00	3,88±0,60
H	2	4,30	4,70	4,50±0,30
GÇ(0 saat)	2	6,23	6,74	6,48±0,25
GÇ(5 saat)	2	5,30	5,90	5,60±0,30
FÇ(0 saat)	2	6,10	6,14	6,12±0,25
FÇ(5 saat)	2	5,48	5,60	5,53±0,62
GP	2	4,72	4,78	4,74±0,31
FP	2	4,30	4,90	4,60±0,30

n= Örnek sayısı

Tablo 2 Lahmacun örneklerinin toplam koliform bakteri sayıları (log kob/g)
Table 2 Total coliform bacteria count of lahmacun samples (log cfu / g)

Örnek	n	Minimum	Maximum	Ortalama±SH
Ç	2	2,60	2,77	2,68±0,31
H	2	1,00	1,90	1,45±0,25
GÇ(0 saat)	2	5,02	5,12	5,07±0,50
GÇ(5 saat)	2	4,23	4,70	4,46±0,23
FÇ(0 saat)	2	4,33	5,08	5,00±0,75
FÇ(5 saat)	2	3,56	4,03	3,79±0,23
GP	2	1,32	1,48	1,39±0,78
FP	2	1,54	1,70	1,61±0,79

n=Örnek sayısı



Şekil 1 Ph tayini sonuçları

Tablo 3 Geleneksel ve fabrikasyon yöntemlerle üretilmiş isot baharatı ve salçası ile hazırlanmış lahmacunlara panelistlerin verdiği puan ortalamaları

Table 3 Mean scores given by panelists to lahmacuns prepared with isot spice and paste produced by traditional and fabrication methods

	n	Geleneksel yöntemlerle üretilmiş isot baharatı ve salçası ile hazırlanmış lahmacunlar			Fabrikasyon yöntemlerle üretilmiş isot baharatı ve salçası ile hazırlanmış lahmacunlar		
		Minimum	Maximum	Ortalama	Minimum	Maximum	Ortalama±SH
Tat	50	1	5	3.9±0.16	1	5	2.7±0.13
Görünüm	50	2	5	4.3±0.21	1	5	3.3±0.26
Koku	50	1	5	3.8±0.08	1	5	2.8±0.72
Kıvam	50	1	5	3.8±0.14	1	5	2.8±0.48

n: kişi sayısı

TARTIŞMA

Yapılan duyu analizler sonucunda geleneksel ve fabrikasyon yöntemlerle üretilmiş isot baharatı ve salçası kullanılarak hazırlanan lahmacun grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu görülmüştür. Geleneksel yöntemler ile üretilmiş isot baharatı ve salçası kullanılarak hazırlanmış lahmacunları tat, görünüm, koku ve kıvam açısından daha yüksek puan almıştır. Fabrikasyon yönteminde isot baharatı ve salçasının üretim aşamasında yüksek ısıda kısa süreli olması, bunun aksine geleneksel yöntemde güneşte uzun süre bekletilmesinin, isot baharatı ve salçasının rengini, kıvamını ve tadını etkilediği düşünülmektedir.

Yapılan mikrobiyolojik analizler sonucunda geleneksel ve fabrikasyon yöntemlerle üretilmiş isot baharatı ve salçası kullanılarak hazırlanan lahmacun arasında istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir. Isot baharatı ve salçası üretim şeklinin farklı olması kırmızıbiberlerin içerdikleri kapsaisin miktarını etkilemediğini ve dolayısıyla benzer oranlarda antibakteriyel etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Ancak çiğ dana kıyması ile baharatlar katılmış lahmacun harcı 5 saat bekletildiğinde iki grupta da mikrobiyal açıdan fark olduğu görülmüştür. Bu farkın sebebinin muhtemelen pH'dan kaynaklanmadığı olmadığı için, kırmızıbiberde bulunan kapsaisin antibakteriyel etkisinden

dolayı ve ayrıca lahmacun harcı içine koyulan sarımsak, tuz, karabiber ve soğanın da gösterdiği antibakteriyel etkisinden dolayı olduğu düşünülmektedir.

Lahmacun harcı ile pişmiş lahmacunlar arasında da önemli farklar tespit edilmiştir. Uygulanan ısıl işlemi lahmacunun mikrobiyal yükünü düşürmüştür ancak tamamen yok etmemiştir. İlhak ve ark. (18) kıymalı pidelerde yapmış oldukları bir çalışmada da farklı süre ve sıcaklıklarda pişirilen kıymalı pidelerin, *E. coli* O157:H7 açısından 180 °C 5,5 dk. pişirilmesi sonucunda ancak güvenli olabileceğini bildirmişlerdir. Durmaz ve ark. (1) yapmış oldukları bir çalışmada lahmacunu 240-260 °C pişirdikten sonra taze pişmiş lahmacunda TMAB sayısını ortalama 2.68±0.71 log kob/g düzeyinde *E. coli* bakteri sayısını ortalama 0.68±0.71 log kob/g düzeyinde tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmalarda da görüldüğü gibi pişirme işleminin mikrobiyal yükü tamamen sıfıra düşürmemiştir. Bu açıdan mevcut çalışmada elde edilen bulgular, literatüdeki bulgularla benzerlik göstermektedir.

Dorantes ve ark. (19) disk difüzyon yöntemi ile yaptıkları bir çalışmada, çeşitli kırmızıbiber ekstraktlarının (0.02, 0.06, 0.1, 0.3, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5 ve 2.5 ml / 100 g dozlarında) *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ve *Salmonella Typhimurium*'un üremesini baskıladığını rapor

etmişlerdir. Koffi-Nevry ve ark. (20) yapmış oldukları bir çalışmada *Capsicum annuum* ve *Capsicum frutescens*'un *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhimurium*'a karşı etkili olduğunu, Soetarno ve Sukrasno 'nun (21) yapmış oldukları araştırmada ise *Capsicum*'un üç farklı türünden elde edilen etanolik ekstraktlarının Gram +, Gram - bakteriler ve küflere karşı antimikrobiyal aktivitelerinin benzer olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan bu çalışmaların sonuçlarına göre kırmızıbiberlerde bulunan kapsaisinin antibakteriyel etkisi olduğunun ve dolayısıyla yapmış olduğumuz bu çalışmada da lahmacun harcına katılan isot baharatı ve salçasında bulunan kapsaisinin lahmacun harcındaki mikrobiyal azalmanın muhtemel sebebi olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak özellikle Güneydoğu Anadolu bölgesinde çokça tüketilen lahmacun, çiğköfte ve kebab gibi et ürünlerinde isot baharatı ve salçasının kullanılması ürünün duyuusal lezzetini olumlu yönde etkilediği kanısına varılmıştır. Ayrıca lahmacun harcı hazırlanmasında kullanılan isot baharatı ve salçasının geleneksel ev yapımı veya fabrika üretimi olması lahmacunun mikrobiyolojik kalitesi açısından bir fark oluşturmadığı ancak duyuusal olarak önemli fark oluşturduğu istatistiksel olarak ortaya konulmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada lahmacun harcının hazırlanmasında yardımcı olan Veteriner Hekim Yakup YILMAZTEKİN'e Teşekkür ederiz

KAYNAKLAR

1. Durmaz H, Altun SK, Aydemir ME. Farklı çözdürme yöntemlerinin lahmacunun mikrobiyolojik kalitesi üzerine etkisi. Harran Üniv Vet Fak Derg. 2018;7: 33-36.
2. Vengaiyah PC, Pandey JP. Dehydration kinetics of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). J Food Eng 2018;81(2):282-286.
3. Korkmaz A, Aydoğdu MH, Mutlu N, Atasoy AF. Geleneksel ve fabrikasyon yöntemiyle üretilen isot baharatlarının bazı fizikokimyasal ve renk özelliklerinin belirlenmesi. Harran Tar ve Gıda Bil Derg. 2016;20(3): 204-213.
4. Baysal T, Güreş H, Yurdagel Ü. Biber salçası yapımında palper öncesi farklı haşlama yöntem ve sürelerinin palper verimi ve şıra kalitesine etkileri. Gıda. 1980; 15(2).
5. Atasoy AF, Hayoğlu İ, Korkmaz A, Kara E, Yıldırım A. Geleneksel ev isot baharatının aflatoksin içeriğinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. Harran Tar ve Gıda Bil Derg. 2017; 21(1): 35-40.
6. Çiçek H, Yılmaz N, Çelik A, Ceylan NÖ, Meram İ. Kapsaisinin (Kırmızı Biber) insan sağlığı üzerine etkileri. Erişim:https://docplayer.biz.tr/56753594. (Erişim tarihi: 07.08.2019)
7. Careaga M, Fernandez E, Dorantes L, et. al. Antibacterial activity of capsicum extract against *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. Int J Food Microbiol. 2003;83(3): 331-335.
8. Datta P, Pramanik K.C, Mehrotra S, Srivastava S. K. Capsaicin mediated oxidative stress in pancreatic cancer. In cancer. Academic Press, pp: 241-246, 2004.
9. Dundar, Y. Fitokimyasallar ve sağlıklı yaşam. Kocatepe Tıp Dergisi. 2001; 2(2).
10. Arın B. Et ürünlerinde kullanılan bazı baharatların antibakteriyel ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi Fen

Bilimler Enstitüsü, İstanbul, 2009.

11. Ekici L, Öztürk İ, Sağdıç O, Yetim H. Et ve et ürünlerinde baharatların doğal antioksidan ve antimikrobiyal olarak kullanımı. Erciyes Üniv Fen Bil Enst Fen Bil Derg. 2014;30(1):66-72.
12. Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJP, Begin A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. Int J Food Microbiol. 1997;37: 155-162.
13. Pichhardt K. Gıda Mikrobiyolojisi (Gıda Endüstrisi için Temel Esaslar ve Uygulamalar). Literatür Yayıncılık, İstanbul, 2004.
14. Bridson EY. The Oxoid Manual. 8th Edition. Oxoid Ltd, Hampshire, England, 1998.
15. Harrigan WF. Laboratory Methods in Food Microbiology. 3rd Edition, Academic Pres, London, 1998.
16. Kurtcan Ü, Gönül M. Gıdaların duyuusal değerlendirilmesinde puanlama metodu. EÜ Mühendislik Fakültesi Dergisi. 1987; 5: 137-146.
17. IBM SPSS, IBM Corp. Released 2012: IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: USA
18. İlhak O.İ, Dikici A, Can Ö.P, Şeker P, Öksüztepe G, Çalıcıoğlu M. Effect of cooking procedures of kıymalı pide, a traditional Turkish fast-food, on destruction of *Escherichia coli* O157:H7. Meat Sci. 2013; 94(2), 159-163.
19. Dorantes L, Fernández E, Sánchez HH. Antimicrobial activity of *Capsicum* extracts against some pathogenic bacteria. Proceedings of the 16th International Pepper Conference, 2002 November, Mexico.
20. Koffi-Nevry R, Kouassi KC, Nanga ZY, Koussémon M, Loukou GY. Antibacterial activity of two bell pepper extracts *Capsicum annuum* L. and *Capsicum frutescens*. Int J Food Prop. 2012;15(5): 961-971.
21. Soetarno S, Sukrasno E. Antimicrobial activities of the ethanol extracts of *capsicum* fruits with different levels of pungency. J Mat dan Sains 1979;2 (2): 57-63.

The effect of Calcitriol 1,25 (OH)₂ - D₃ on osteoblast-like cell proliferation during in vitro cultivation

Muhamed KATICA¹, Filiz TEPEKÖY²

¹University of Sarajevo, Veterinary Faculty, Department of Pathologic Physiology of Domestic Animals, Sarajevo/BOSNIA AND HERZEGOVINA

²Atınbaş University, School of Medicine, Department of Histology&Embryology, Istanbul/TURKEY

Key Words:

osteoblast-like cells
rat
calcitriol
in vitro cultivation

Received: 29.11.2019

Accepted: 05.03.2020

Published Online: 30.04.2020

Article Code:653000

Correspondence:

M. KATICA
(muhamed.katica@vfs.unsa.ba)

ORCID:

M. KATICA: 0000-0002-8184-0065

F. TEPEKÖY: 0000-0003-1901-3787

ABSTRACT

Osteoblasts are one of the leading components of the bone tissue, derived from mesenchymal stem cells (MSCs) under the influence of various local factors and growth hormones. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol), an active form of vitamin D, plays an important role in retaining calcium and phosphate homeostasis within the body. Since vitamin D is also known to have effects on cell proliferation, our study aimed to investigate the effects of different concentrations of calcitriol on the proliferation of in vitro cultured osteoblast-like cells from the bone marrow of 90-95 days old young adult rats of both sexes. Calcitriol was applied at six (6) different concentrations (nM): 0.1, 1, 10, 20, 40 and 60. Each concentration was tested four times, counting the cells after 24 and 48 hours. After 24 and 48 hours treatment, the most effective dose of calcitriol for cell proliferation was 0.1 nM for both males and females. The greatest reduction in the frequency of osteoblast-like cells from both sexes after treatment of 24 and 48 hours, was a 60 nM calcitriol concentration. Higher proliferative values of osteoblast-like cells were obtained in males compared to those obtained in females. Thus, the results of the current study reveal that calcitriol treatment induces the proliferation of osteoblast-like cells in a dose-dependent manner and this effect shows difference in cells from different genders.

INTRODUCTION

Osteoblasts originate from mesenchymal stem cells (MSCs) that later change into pre-osteoblasts under the influence of various local factors and growth hormones. These factors decide whether these cell precursors will change into osteoblastic or other cell types, such as fibroblast, fat cells or chondrocytes (1). The osteogenic differentiation of MSCs is mainly regulated by molecular components associated with embryonic skeletal development (2) and have recently been found to be achieved by interaction of key signaling pathways related to osteogenesis (3).

The proliferation and differentiation of cells of the osteoblastic lineage are controlled and guided by numerous transcription factors, growth factors and hormones (4, 5). The hormones are responsible for regulating calcium homeostasis and bone remodeling act as designators of osteoblast differentiation through activation of particular transcriptional regulators (6). Bone regeneration was induced by the growth factors related to the bone development through stimulation of osteogenic cell differentiation via a cell signaling cascade, eventually promoting alveolar bone regeneration (7).

Besides hormones and growth factors, the maintenance and achievement of the regular organization of bone tissue are also conducted with the contribution of vitamins and minerals. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol), an active form of vitamin D, plays an important role in retaining calcium and phosphate homeostasis within the body. In addition to its function in preserving mineral composition, it has main roles in various bodily functions, including its contribution to immune system and antitumoral activities, as well as the maintenance of bone growth (8). Additionally, calcitriol has a particularly important place in bone tissue metabolism (9). The importance of Vitamin D compounds on cellular basis was

also investigated and these compounds have been suggested to alter cellular proliferation through several mechanisms, most effectively via effects on cell cycle progression, apoptosis, and differentiation in highly cell-specific manners (10).

MSCs, which can be isolated from several adult tissues including bone marrow aspirations, are capable of inducing bone repair and regeneration in cell reconstructive therapies (11). Recently, a number of studies have revealed the effects of Vitamin D on the differentiation of osteoblasts and, more recently, on MSCs (12). Calcitriol has been found to be osteo-inductive, and to have the capacity of promoting in vitro the differentiation of human MSCs into osteoblasts (13).

Researchers' conflicting views on the use of vitamin D₃ are evident. Some prefer its use in children and adults with certain osteopathies. Others do not support its use in curation, finding it unnecessary (14, 15). Though the effects of calcitriol supplement on the growth of bone matrix were investigated and its increasing effects on the mineral intensity were determined (16), its participation on proliferation of osteoblast like cells needs further investigation.

Osteoblast cell cultivation allows the cells grow under controlled conditions, through which a test cell is available to us at any time and on which we can directly apply the desired concentrations, in our case of calcitriol, bypassing the digestive tract. Maniatopoulos et al. (17) cultured osteoblast-like cells in young rats during the biopsy of bone marrow stromal cells. Most of the recent in vitro studies regarding osteoblast-osteocyte interaction are invariably performed with rodent cells, mostly murine cells, which diminishes the clinical relevance of the data (18, 19).

The aim of the study was to determine the effect of

different concentrations of calcitriol on the proliferation of in vitro cultured osteoblast-like cells from the bone marrow of 90-95 days old young adult rats of both sexes.

MATERIALS and METHODS

Animals

The experimental animals were treated under standard laboratory conditions, with adequate nutrition and treatment of trained staff. The study was conducted on 14 albino Wistar rats, of which 7 were males and 7 female rats, 90 to 95 days old and of an average weight of about 220-270 grams. The rats had free access to food and water and 12-hour shift of light and darkness. The air temperature was between 20 and 23 °C with 60%±10% air humidity. The animals were preoperatively selected so that they had a strong immune system and were free of all viral and parasitic diseases. The experimental procedures during this study did not conflict with the Law on Animal Welfare of Bosnia and Herzegovina (Official Gazette of Bosnia and Herzegovina, number 25/09).

Surgical procedures

Animals were sedated with lethal doses of Pentobarbitone at doses higher than 40 mg/kg, i.m. (9). The hairy covering in the hindlimb region was removed. The operating area was disinfected with 70% isopropanol. The skin and subcutaneous tissue were removed, as well as the muscles of thigh and shin region. The next step involved extraction of the hind limbs with musculature, separation at the aceto-femoral (hip) and tarsal joints. The tops of the femurs and tibia were removed, thus making the bone marrow accessible and a 21-gauge needle was used for extrusion of the bone marrow.

Isolation and primary cell culture of bone marrow cells

The obtained bones were washed several times with α - MEM medium (α - minimal essential medium) to which a common antibiotic was added. Marrow plug suspension was dispersed by pipetting, filtered through 70- μ m mesh nylon filter, and centrifuged at 200 \times g for 10 min. After centrifugation, the supernatant containing thrombocytes and erythrocytes was decanted and the bone marrow cells were resuspended with 10 ml α - MEM, where the common antibiotics were

previously placed: 100 μ g/ml Penicillin G, 50 μ g/ml Gentamicin sulphate. The cells in the medium supplemented with 10% FBS were transferred to a plastic culture flask, (75 cm² plastic culture flask - Falcon TM, Div. Becton Dickinson and Co., Oxnard, Ca.), sl. 9. The prepared vials with half-closed stopper were immediately transferred to a special incubator with a temperature ambient of 37°C, with a presence of 95% air and 5% CO₂. The cells were approximately seeded in density of 1X10³ cell/vial, after the first preliminary microscopic examination. We constantly monitored the maturation of osteoblast-like cells under a light microscope, with magnification of 10X or 40 X. On the third day the medium was changed by adding 0,7 ml 10% of FBS. On day six, the medium was enriched with 10 mM Na- β -glycerophosphate (β -GP), 10-8 M Dexamethasone (Dx) and 50 μ g/mL ascorbic acid (17). After the sixth day, the medium was being changed every other day.

Subculture of bone marrow cells

On the day 12 the bone marrow cells of the examined rats were subcultured (I passage), by applying the conventional methods of porcine trypsin use obtained from the exocrine portion of the pancreas (17). We emptied the medium from small plastic vials and injected 1ml of pork trypsin, which was

previously heated in a water bath at 37°C, for 3-5 minutes. 18 ml α MEM was added into the same plastic culture flasks (75 cm² plastic culture flask – Falcon TM, Div. Becton Dickinson and Co., Oxnard, Ca.), and then, using a sterile pipette, after one minute of “shaking” the cells in suspension (from an old small pot), they were transferred to a prepared larger pot in which the medium was previously placed. Finally 1,8 ml FBS was added. The subcultured cells were placed back into an incubator at the temperature of 37°C, 100% relative humidity, and 5% of CO₂ and 95% of pure air presence. The medium was being changed every other day, and the cultured cells constantly monitored using a light microscope. Over the next six days, the cells gradually progressed and the preconditions were made for the passage II, that is, for their preparation in suspension for the test.

Calcitriol application (1,25(OH)2D3)

Prepared cells in suspension after treatment with trypsin were transferred to a sterile plastic plate with appropriate dents (24 pieces). 1 ml of cells in suspension were placed into every dent using an automatic pipette and two plates were filled, 48 dents. A third, separate plate with 24 dents was a control one. Calcitriol was applied (1,25(OH)2D3), (Hoffman- La Roche) at six (6) different concentrations (nM) : 0.1, 1, 10, 20, 40 and 60. Each concentration was tested four times, counting the cells after 24 and 48 hours.

Counting cells

The cells were counted manually, using Thoma's hemocytometer, under the binocular light microscope Motic Type 102 M, with magnification 40X, according to the below-mentioned formula:

Counted cell number X 1000 X dilution factor, to obtain the number of cells in 1mm³ in the suspension (1 \times 10⁻³/ml) (20). Most representative fields were electronically recorded using Motic Images Plus 2.0 software.

Statistical analysis

All data obtained in the study were processed and analyzed using the following methods of statistical analysis: Standard Error, Statistical Significance (T-Test), T-Test for small dependent samples.

RESULTS and DISCUSSION

The results of the current study reveal that calcitriol treatment induces the proliferation of osteoblast-like cells in a dose-dependent manner. Over the next few days of culture of osteoblast-like cells, an evident onset of osteoblast cell maturation was observed (fibroblasts targeting the osteoblastic phenotype) (Figure-1). The most effective activity on the proliferation of osteoblast-like cells, originating from both males and females, after a treatment of 24 and 48 hours, is a 0.1 nM calcitriol concentration, which increases the number of cells tested by about 40% relative to control cells (Tables 1, 2, 4 and 5). The greatest reduction in the frequency of osteoblast-like cells from males after treatment of 24 (Table-1) and 48 hours (Table-4) was a 60 nM calcitriol concentration, which reduced the number of cells tested by 75.3% relative to controls. In females, the number of osteoblast-like cells was reduced by 93.9%.

The results of our study show that slightly higher proliferative values of osteoblast-like cells were obtained in males compared to those obtained in females (Table 3). The test cells originating from males were partly more resistant to the maximum concentrations of calcitriol (60 nM), compared to test cells originating from females, by 18.6% (Table 3).

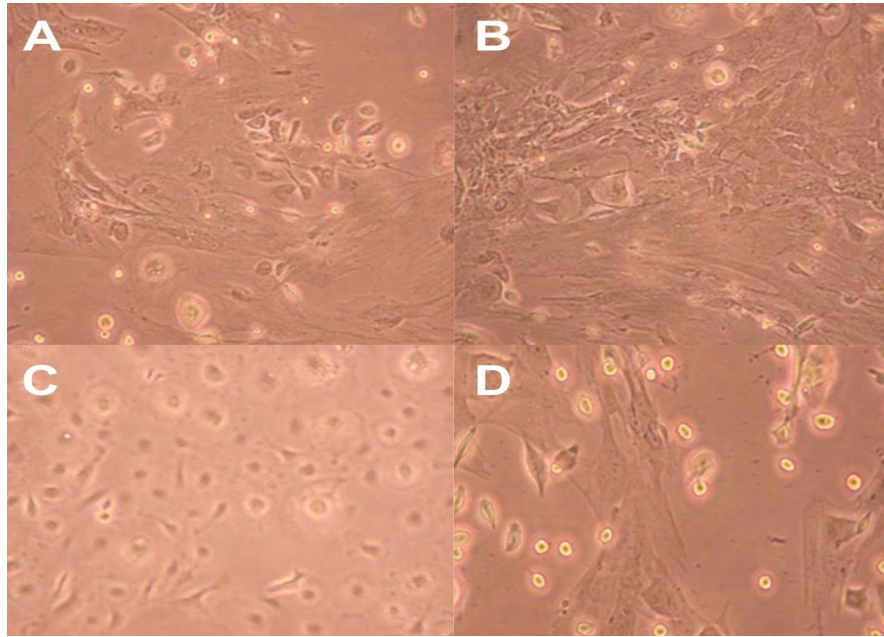


Figure 1 Microscopic photographs of test OB-like cells after the application of different concentrations of calcitriol (24 and 48 hours).

Control OB-like cells in males (A). OB-like cells in males after the application of calcitriol (24 hours) conc. 0,1 nM (B). Proliferation of OB-like cells evident (B), relative to the control OB-like cells (A). OB-like cells in males after the application of calcitriol conc.10 nM (48 hours). Obvious high numerical representation of OBs relative to the control, as well as evident destruction of certain cells (C). OB-like cells in females after the application of calcitriol conc. 20 nM (48 hours). OBs as well as corpuscles refracting light are present.

Table 1 Results obtained after application of six different concentrations of 1,25-(OH)₂-D₃ Calcitriol on osteoblast-like cells of males after 24 hours

	Concentration (nM)	Number of dents on a plastic plate (n)	Arithmetic mean (10 ³)	Standard deviation (S.D.)	T-Test significance of differences relative to the control group
Males	60	4	0.9	0.1581	t=15,011 SIGN.p<0.01
	40	4	2.1	0.2345	t=7,229 SIGN.p<0.01
	20	4	3.2	0.2549	t=1,498 NOT SIGN.
	10	4	3.0	0.0	t=3,244 SIGN.p<0.05
	1	4	5.5	0.3082	t=9,177 SIGN.p<0.01
	0.1	4	6.0	0.4301	t=9,449 SIGN.p<0.01
	Control group	4	3.5	0.3082	-

Our research is in line with that of (21), in the part related to the results obtained after calcitriol application. Wong et al. (21) in their study found increased alkaline phosphatase activity. In our case, we received increased osteoblast proliferation. According to Wlodarski, 1990 (22) and Vierecek et. al., 2002 (23), the increased activity of ALP as a major marker of osteoblast activity is necessarily accompanied by an increase in their proliferation.

It has been previously confirmed that Vitamin D affects osteoblast formation from MSCs derived from adipose tissue (24). However, there are several tissue types serving as a source for MSC such as bone marrow, adipose tissue, skin, and fetal tissues; and little is known about Vitamin D influence in osteogenic differentiation of MSCs from these alternative sources (25). The results of our study reveal the inducing effect of calcitriol on proliferation of osteoblast like cells obtained from the bone marrow.

In previous studies investigating the roles of calcitriol on

bone metabolism, it was determined that calcitriol had affected bone matrix protein expression in cultured cells (26) and it was also found to modulate bone deposition process avoiding excessive and pathological mineralization (27). In addition to these studies regarding the protein expression in osteoblasts, other studies have revealed the roles of calcitriol on osteoblast growth and differentiation stimulating bone formation (28). In the current study, we focused on the effects of calcitriol on proliferation ability of osteoblast like cells, rather than their metabolic activity.

As demonstrated in previous studies, the bone extracellular matrix (ECM) includes molecules capable of defining cell differentiation through the activation of integrin subunits and providing signals that will successfully initiate and sustain cell adhesion, growth, proliferation and migration processes (29, 30). For proliferation, commitment, and differentiation of MSCs, cell adhesion to the substrate is also a critical process (31). It was previously shown that the use of titanium substrates and Vitamin D had an additive effect in regulating

Table 2 Results obtained after application of six different concentrations of 1,25-(OH)₂-D₃ Calcitriol on osteoblast-like cells of females after 24 hours

	Concentration (nM)	Number of dents on a plastic plate (n)	Arithmetic mean (10 ³)	Standard deviation (S.D.)	T-Test significance of differences relative to the control group
Females	60	4	0.2	0.1581	t=35,796 SIGN,p<0.01
	40	4	2.3	0.1225	t=14,144 SIGN,p<0.01
	20	4	3.4	0.1732	t=1.069 NOT SIGN.
	10	4	3.2	0.2739	t=0.707 NOT SIGN.
	1	4	5.0	0.3240	t=10,251 SIGN,p<0.01
	0.1	4	5.3	0.0829	t=36,248 SIGN,p<0.01
	Control group	4	3.3	0.0707	-

Table 3 Significance of differences in mean values between males and females, T-test, after application of 1,25-(OH)₂-D₃ - calcitriol, after 24 hours

Concentration (nM) 1,25(OH) ₂ -D ₃	Significance of differences in mean values between males and females, T-Test	
60	t=6.261	SIGN,p<0,01
40	t=1.5119	NOT SIGN.
20	t=1.298	NOT SIGN.
10	t=1.461	NOT SIGN.
1	t=2.236	NOT SIGN.
0.1	t=3.378	SIGN.p<0,05
Control group	t=1.265	NOT SIGN.

Table 4 Results obtained after the application of six different concentrations of 1,25-(OH)₂-D₃ - calcitriol on osteoblast-like cells in males after 48 hours

	Concentration (nM)	Number of dents on a plastic plate (n)	Arithmetic mean (10 ³)	Standard deviation (S.D.)	T-Test significance of differences relative to the control group
Males	60	4	0.8	0.1275	t=13.655 SIGN,p<0.01
	40	4	2.1	0.1871	t=7,667 SIGN,p<0.01
	20	4	3.2	0.1785	t=1.046 NOT SIGN.
	10	4	3.5	0.3536	t=0.707 NOT SIGN.
	1	4	5.1	0.0707	t=11.662 SIGN,p<0.01
	0.1	4	5.5	0.2449	t=11,225 SIGN,p<0.01
	Control group	4	3.4	0.2828	-

Table 5 Results obtained after the application of six different concentrations of 1,25-(OH)₂-D₃-calcitriol on osteoblast-like cells in females after 48 hours

Females	Concentration (nM)	Number of dents on a plastic plate (n)	Arithmetic mean (103)	Standard deviation (S.D.)	T-Test significance of differences relative to the control group
	60	4	0.2	0.1871	t=9.61 SIGN.p<0.01
	40	4	2.6	0.4062	t=1.183 NOT SIGN.
	20	4	3.4	0.2121	t=0.338 NOT SIGN.
	10	4	3.2	0.0	t=0.465 NOT SIGN.
	1	4	5.0	0.561	t=4.808 SIGN.p<0.05
	0.1	4	5.3	0.200	t=8.433 SIGN.p<0.001
Control group	4	3.3	0.4301	-	

Table 6 Significance of differences in mean values between males and females, T-test, after the application of 1,25-(OH)₂-D₃-calcitriol, after 48 hours

Concentration (nM) 1,25(OH) ₂ -D ₃	Significance of differences in mean values between males and females, T-Test	
60	t=2.650	NOT SIGN.
40	t=2.236	NOT SIGN.
20	t=1.262	NOT SIGN.
10	t=1.697	NOT SIGN.
1	t=0.172	NOT SIGN.
0.1	t=1.265	NOT SIGN.
Control group	t=0.188	NOT SIGN.

Table 7 Results of testing the significance of differences after 48 hours and 24 hours using T-Test (males)

Males	Concentration (nM)	Average difference d	T-Test	
	60	-0.1	t=0.489	NOT SIGN.
	40	0.0	t=0.0	NOT SIGN.
	20	0.025	t=0.077	NOT SIGN.
	10	0.5	t=2.451	SIGN.p<0,10
	1	-0.4	t=2.771	SIGN.p<0,10
	0.1	-0.5	t=1.715	NOT SIGN.
Control group	-0.1	t=1.091	NOT SIGN.	

Table 8 Results of testing the significance of differences after 48 hours and 24 hours using T-Test (females)

	Concentration (nM)	Average difference d	t	T-Test
Females	60	0.0	t=0.0	NOT SIGN.
	40	0.35	t=1.578	NOT SIGN.
	20	0.0	t=0.0	NOT SIGN.
	10	0.0	t=0.0	NOT SIGN.
	1	0.0	t=0.0	NOT SIGN.
	0.1	0.025	t=0.181	NOT SIGN.
	Control group	0.0	t=0.0	NOT SIGN.

the integrin expression of human osteoblast-like cells, promoting the cell adhesion process (32). Vitamin D was also found to be related to osteogenic differentiation of MSCs through the activation of cell adhesion molecules (33). Thus, increased proliferation rate of osteoblast-like cells in our study by addition of calcitriol, might also be related to elevated levels of cell adhesion molecules.

Conditions such as osteoporosis, osteoarthritis, and spinal disorders were observed in females in a greater extent than males (34). The difference in rate of such diseases between females and males has been considered to be related to the difference in levels of circulating sex hormones: estrogen and testosterone (35). However, currently a novel perspective has emerged, suggesting that the differences in bone properties, including morphology and size are caused by the genetic differences in male and female cells, which contribute to sexual dimorphism between males and females (36). Sex-dependent effect of calcitriol on rat osteoblasts grown in titanium implants was also discovered previously, showing possible sex-specific effects of calcitriol on osseointegration of titanium implants (37). In recent studies it was demonstrated that different culture conditions affected the expression of proteins related to osteoblast cell function and organic components of the bone matrix in a sex-dependent manner (38). As demonstrated previously, female and male osteoblasts display differences in average basal characteristics on tissue culture polystyrene, with female cells having higher cellular alkaline phosphatase activity and levels of osteocalcin, as well as higher concentration of both forms of Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF-β1) in their conditioned media compared to male cells. In contrast, male cells were found to have greater basal levels of osteoprotegerin production (38). After the evaluation, E2 treatment was shown to be related to reduced cell number only in female cells (38). In the current study, it was revealed that osteoblast-like cells obtained from males displayed a higher proliferation rate compared to those obtained from females, suggesting that calcitriol treatment might also affect osteoblast-like cell proliferation in a sex-dependent manner.

It is possible to grow primary culture of osteoblast-like cells taken from the bone marrow of young adult Wistar rats, 90-95 days old. Calcitriol has been found to improve the proliferation of osteoblast-like cells during the application of at least a concentration of 0.1 nM. It was revealed that osteoblast-like cells obtained from males displayed a higher proliferation rate compared to those obtained from females, suggesting that calcitriol treatment might also affect osteoblast-like cell proliferation in a sex-dependent manner. A better understanding of the biology of osteoblasts is a prerequisite

for better curation of diseased calcified tissues, as those are permanently exposed to numerous diseases and lesions of different traumatic, developmental and postoperative resection etiologies.

REFERENCES

1. Lagumdžija A., The effects of some peptide hormones on osteoblast-like cells- with specific fokus on pitocin and vasopresin. Doctoral thesis. The Endocrine and Diabetes Unit Department Institutet, Sweden, 2005.
2. Olsen BR., Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000; 16: 191-220.
3. Cui J, Zhang W, Huang E, Wang J, Liao J, Li R., et al. Bmp9-induced osteoblastic differentiation requires functional notch signaling in mesenchymal stem cells. *Lab Invest.* 2019; 99(1): 58-71.
4. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 2006; 99: 1233-39.
5. Katica M. Effects of vitamin D3 and calcium on the establishment of primary osteoblast culture. Master's thesis. University of Sarajevo, Faculty of Sciences. Bosnia and Herzegovina, 2007.
6. Arumugam B, Vishal M, Shreya S, Malavika D, Rajpriya V, He Z, et al. Parathyroid hormone-stimulation of runx2 during osteoblast differentiation via the regulation of lnc-supt3h-1:16 (runx2-as1:32) and mir-6797-5p. *Biochimie.* 2019; 158(10): 43-52.
7. Anusaksathien O & Giannobile WV. Growth factor delivery to re-engineer periodontal tissues. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002; 3(2): 129-139.
8. Minghetti PP & Norman AW. 1,25(OH)₂-vitamin d3 receptors: Gene regulation and genetic circuitry. *FASEB J.* 1988; 2(15): 3043-53.
9. Čupić V, Muminović M, Kopal S, Velev R. Pharmacology for students of faculties of veterinary medicine, 2nd ed. Belgrade: Naučna, KMD; 2014. p.141-146; 429-432.
10. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin d receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005; 26(5): 662-67.
11. Chiu LH, Lai WF, Chang SF, Wong CC, Fan CY, Fang CL, et al. The effect of type ii collagen on msc osteogenic

- differentiation and bone defect repair. *Biomaterials*. 2014; 35(9): 2680-91.
12. Posa F, Di Benedetto A, Cavalcanti-Adam EA, Colaianni G, Porro C, Trotta T. Vitamin d promotes msc osteogenic differentiation stimulating cell adhesion and alphavbeta3 expression. *Stem Cells Int*. 2018a; 6958713: 1-9.
13. Liu P, Oyajobi BO, Russell RG, Scutt A. Regulation of osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells: Interaction between transforming growth factor-beta and 1,25(OH)₂ vitamin d(3) in vitro. *Calcif Tissue Int*. 1999; 65: 173-80.
14. Bolland MJ & Grey A. A case study of discordant overlapping meta-analyses: Vitamin d supplements and fracture. *PLoS One*. 2014; 9(12): e115934.
15. Macdonald HM, Reid IR, Gamble GD, Fraser WD, Tang JC, Wood AD. 25-hydroxyvitamin d threshold for the effects of vitamin d supplements on bone density: Secondary analysis of a randomized controlled trial. *J Bone Miner Res*. 2018; 33(8): 1464-69.
16. Reid IR, Bolland MJ, Grey A. Effects of vitamin d supplements on bone mineral density: A systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2014; 383: 146-55.
17. Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res*. 1988; 254(2): 317-30.
18. Paine A, Woeller CF, Zhang H, de la Luz Garcia-Hernandez M, Huertas N, Xing L, et al. Thy1 is a positive regulator of osteoblast differentiation and modulates bone homeostasis in obese mice. *FASEB J*. 2018.; 32(6): 3174-83.
19. Buettmann EG, McKenzie JA, Migotsky N, Sykes DA, Hu P, Yoneda S, et al. Vegfa from early osteoblast lineage cells (osterix+) is required in mice for fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2019; 34(1): 1690-706.
20. Davis JM. Basic cell culture – a practical approach. 1st ed. Oxford University, Oxford: IRL Press; 1996. p. 80-90.
21. Wong GL, Luben RA, Cohn DV. 1,25-dihydroxycholecalciferol and parathormone: Effects on isolated osteoclast-like and osteoblast-like cells. *Science*, 1977; 197: 663-65.
22. Wlodarski K H. Properties and origin of osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res*. 1990; 276-93.
23. Viereck V, Siggelkow H, Tauber S, Raddatz D, Schutze N, Hufner M. Differential regulation of cbfa1/runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-d3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2002; 86: 348-56.
24. Logovskaya LV, Bukharova TB, Volkov AV, Vikhrova EB, Makhnach OV, Goldshtein DV. Induction of osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells from human adipose tissue. *Bull Exp Biol Med*. 2013; 155(1): 145-50.
25. Posa F, Di Benedetto A, Colaianni G, Cavalcanti-Adam EA, Brunetti G, Porro C, et al. Vitamin d effects on osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from dental tissues. *Stem Cells Int*. 2016; 2016: 9150819.
26. Bellows CG, Reimers SM, Heersche JN. Expression of mrnas for type-i collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25 dihydroxyvitamin d3. *Cell Tissue Res*. 1999; 297(2): 249-59.
27. Woeckel VJ., van der Eerden BC, Schreuders-Koedam M, Eijken M, Van Leeuwen JP. 1alpha,25-dihydroxyvitamin d3 stimulates activin a production to fine-tune osteoblast-induced mineralization. *J Cell Physiol*. 2013; 228(11): 2167-74.
28. van de Peppel J & van Leeuwen JP. Vitamin d and gene networks in human osteoblasts. *Front Physiol*. 2014; 5: 137.
29. Schneider GB, Zaharias R, Stanford C. Osteoblast integrin adhesion and signaling regulate mineralization. *J Dent Res*. 2001; 80(6): 1540-4.
30. Hamidouche Z, Fromigue O, Ringe J, Haupl T, Vaudin P, Pages JC, et al. Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(44): 18587-91.
31. Wang YK & Chen CS. Cell adhesion and mechanical stimulation in the regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J Cell Mol Med*. 2013; 17(7): 823-32.
32. Raz P, Lohmann CH, Turner J, Wang L, Poythress N, Blanchard C, et al. 1alpha, 25(OH)2d3 regulation of integrin expression is substrate dependent. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 71: 217-25.
33. Posa F, Di Benedetto A, Cavalcanti-Adam EA, Colaianni G, Porro C, Trotta T, et al. Vitamin d promotes msc osteogenic differentiation stimulating cell adhesion and alphavbeta3 expression. *Stem Cells Int*, 2018b; 6958713:1-9.
34. Tosi LL, Boyan BD, Boskey AL. Does sex matter in musculoskeletal health? The influence of sex and gender on musculoskeletal health. *J Bone Joint Surg Am*. 2005; 87: 1631-47.
35. Jochems C, Islander U, Erlandsson M, Engdahl C, Lagerquist M, Gjertsson I, et al. Role of endogenous and exogenous female sex hormones in arthritis and osteoporosis development in b10.Q-ncf1^{*/*} mice with collagen-induced chronic arthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010; 11: 284.
36. D'Amelio P, Rossi P, Isaia G, Lollino N, Castoldi F, Girardo M, et al. Bone mineral density and Singh index predict bone mechanical properties of human femur. *Connect Tissue Res*. 2008; 49: 99-104.
37. Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Boyan BD, Schwartz Z. Regulation of osteoblast differentiation by acid-etched and/or grit-blasted titanium substrate topography is enhanced by 1,25(OH)₂D₃ in a sex-dependent manner. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 365014.
38. Berger MB, Cohen DJ, Olivares-Navarrete R, Williams JK, Cochran DL, Boyan BD, et al. Human osteoblasts exhibit sexual dimorphism in their response to estrogen on microstructured titanium surfaces. *Biol Sex Differ*. 2018; 9(1): 30.

Piyasada satılan surimilerin mikrobiyolojik kalitesinin incelenmesi

Halil YALÇIN

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Burdur/TÜRKİYE

Anahtar Kelimeler:

surimi
deniz ürünleri
E. coli
gıda hijyeni
Pseudomonas spp.

Key Words:

surimi
seafood
E. coli
food hygiene
Pseudomonas spp.

Geliş Tarihi: 09.01.2020
Kabul Tarihi: 10.03.2020
Yayın Tarihi: 30.04.2020
Makale Kodu: 672526

Sorumlu Yazar:
H. YALÇIN
(hyalcin@mehmetakif.edu.tr)

ORCID:
H. YALÇIN: 0000-0003-2162-2418

I. Uluslararası Sağlık Bilimleri ve Yaşam Kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur. 02-05 Mayıs 2018, Burdur.

ÖZ

Surimi, dünyada gün geçtikçe artan deniz ürünleri tüketimi içinde önemli bir paya sahiptir. Deniz ürünleri yakalama, taşıma ve işleme sırasında hasar görerek mikrobiyal kontaminasyona maruz kalabilir. Çalışmamızda satış ve tüketim noktalarından temin edilen 40 adet surimi örneği Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri, *E. coli*, *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* spp. yönünden standart metotlar kullanılarak incelenmiştir. Örneklerdeki Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri sayısı (30 °C) 2.0×10^2 - 2.0×10^6 KOB/g, *E. coli* 3.2×10^2 - 9.0×10^2 KOB/g düzeyinde saptanmıştır. Enterobakter 1.0×10^3 - 2.0×10^3 KOB/g ve *Pseudomonas* spp. sayısı 5.0×10^2 - 3.0×10^3 KOB/g olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre surimi örneklerinin incelenen bakterilerle kontaminasyon seviyesi halk sağlığı açısından bir risk teşkil etmektedir.

Investigation of microbiological quality of surimi sold in the market

ABSTRACT

Surimi has an important share in the increasing consumption of seafood in the world. Seafood may be damaged during capture, transport and processing and this could lead to microbial contamination. In our study, 40 surimi samples obtained from the sales and consumption points were investigated for Total Aerobic Mesophilic Bacteria, *E. coli*, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using standard methods. The total numbers of aerobic mesophilic bacteria (30 °C) and *E. coli* in the samples were determined as 2.0×10^2 - 2.0×10^6 CFU/g, 3.2×10^2 - 9.0×10^2 CFU/g respectively. The numbers of Enterobacter and *Pseudomonas* spp. were determined as 1.0×10^3 - 2.0×10^3 CFU/g, 5.0×10^2 - 3.0×10^3 CFU/g respectively. Findings of the study indicate that the contamination level of surimi samples with the bacteria investigated poses a risk to public health.

GİRİŞ

Beyaz et kaynakları içerisinde önemli bir yeri olan deniz ürünleri tüketiminin artmasıyla uluslararası gıda ticaretinde ilk sıralarda yeri almıştır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonunun (Food and Agriculture Organisation of the United Nations-FAO) 2018 yılı verilerine göre suriminin dünya genelinde üretim miktarı 800.000 ton düzeyine ulaşmıştır (1). Özellikle Uzakdoğu ülkelerinde tüketilmekte olan surimi ülkemiz piyasasında hem yerli üretim hem de ithal kaynaklı olarak bulunmaktadır (2). Surimi beyaz etli balıkların kas dokusunun ezilip karıştırılarak homojen hale getirilmesinden sonra yağ, serbest amino asit ve peptidler gibi bileşenlerinin su ile yıkanarak uzaklaştırılması sonrasında (miyofibriller proteinlerinin konsantresi) içerisine yengeç, ıstakoz veya karides aromaları gibi koku ve tad verici maddelerin eklenmesiyle hazırlanan işlenmiş bir gıda ürünüdür (3-5). Fermente ve çiğ ürünlerinin yanı sıra pişirildikten sonra paketlenip satışa sunulan surimiler, tüketilmeden önce ızgara, fırınlama, haşlama, buharda pişirme ve kızartma gibi ısı işlemlere tabi tutulmaktadır (3, 6). Yetersiz

hijyen ve ısı uygulaması sonucunda surimilerde sporlu bakteriler başta olmak üzere diğer bakteriler canlı kalabilmekte ve 4-12 haftalık soğuk muhafazasında psikrofilik bakteriler çoğalarak kabul edilebilir sınırların üzerine çıkabilmektedir (7). Bununla birlikte surimilerin işlenmesi sırasında kullanılan katkı maddeleri de (patates ve buğday nişastası gibi) bakteriyel kontaminasyona sebep olabilmektedir (8). Araştırmacılar surimilerde toplam bakteri ve psikrofil bakteri sayılarının 10^2 - 10^4 KOB/g düzeyinde bulunabileceğini ve depolama sürecinde bu sayının artabileceğini belirtmişlerdir (9, 10). Surimilerde genel canlı bakterilere bağlı bozulmalar görülebildiği gibi, patojen bakterilerden kaynaklı risklerde ortaya çıkabilmektedir. Nitekim Gonzalez ve ark. (11), inceledikleri 125 surimi örneğinin 6'sında (%4.8) *L. monocytogenes* tespit etmişlerdir. Bunun yanında gıdaların bozulmasına *Corynebacterium*, psikrofilik *Pseudomonas* spp., *Aeromonas*, *Staphylococcus*, *Listeria* spp., *Bacillus* türleri ve koliformların sebep olabileceği ve bu bağlamda deniz ürünleri kaynaklı hastalıkların şekillenebileceği belirtilmektedir (12-16).

Alaska pollock balığından elde edilen surimilerin spor oluş-

turmaya bakterilerle 10^4 - 10^6 KOB/g düzeyinde kontamine oldukları belirtilmiştir (14). Benzer şekilde surimi üretilecek balık kıymalarının yüksek toplam aerobik mezofilik bakteri içerdiğini bildirilmiştir (17). El-Kholie ve ark. (18), bebek gıdalarına ilave edilen, sazan balığından yapılan kurutulmuş surimi örneklerinin sadece birinde 1.7×10^1 KOB/g düzeyinde toplam aerobik bakteri tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Ariyawansa ve ark. (19), küçük balık türlerinde toplam aerobik bakteri sayısını 8.0×10^3 - 2.0×10^8 KOB/g aralığında olduğunu ortaya koymuşlardır. Bunun yanında bazı örneklerde fekal koliform sayısının >1100 EMS/g olarak belirlendiğini, balıkların %70'inin *E. coli* ile kontamine olduğunu, 9 örnekte (9/160) *Salmonella* spp., 8 örnekte (8/160) *L. monocytogenes* tespit ettiklerini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar balıkların yakalandığı su ve soğutmada kullanılan buzların toplam aerobik mezofilik bakteri, koliformlar, fekal koliformlar, *E. coli*, *Fekal streptococci* ve *Salmonella* spp. ile kontamine olduğunu da ortaya koymuşlardır.

İşlenmiş balık ürünlerinde patojen bakterilerin bulunması kontamine kapların, aletlerin, suyun ve buzun kullanıldığına ve hijyenik olmayan uygulamaların yapıldığına işaret etmektedir (20). Adeshina ve ark. (21), balık işleme-hazırlama tezgâhlarının ve aletlerindeki kontaminasyonu ortaya koymuşlardır. Ülkemiz marketlerinde ve tüketim noktalarında yerini alan surimi hijyenik şartlarda üretilmediğinde ve hazırlanmadığında bir çok bakteri ile kontamine olabileme riski yüksektir. Ayrıca bakteriyel faaliyet sonucu surimilerin tad, renk, koku gibi duyuşal özellikleri ve diğer kimyasal kalite kriterlerindeki değışiklikler tüketici tarafından kabul edilemez bir durumdur (22).

Bu çalışmada piyasada satılmakta olan surimilerin bazı mikrobiyolojik nitelikleri incelenerek halk sağlığı açısından risk teşkil edip etmediği araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mersin piyasasından temin edilen 40 adet surimi örneği soğuk zincir altında laboratuvara getirilerek mikrobiyolojik yönden incelenmiştir. Örneklerden aseptik şartlarda 10 g alınarak 90 ml peptonlu su ilave edilmiş (10/90) ve daha sonra homojenizasyon yapılmıştır. Daha sonra seri dilüsyonlar hazırlanmış ve standart metotlar kullanılarak Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri (TAMB), *E. coli*, *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* spp. araştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan besiyerleri ve katkıları Oxoid (USA)'den temin edilmiştir.

TAMB sayımı için Plate Count Agar (Oxoid CM0325, USA) kullanılmıştır. Hazırlanan dilüsyondan bu besiyerine ekim yapılarak 30 ± 1 °C'de, 48 ± 2 saat inkübasyona bırakılmış ve sonrasında petrideki tüm koloniler sayılmıştır (23). Çalışmada *E. coli* tespiti için hazırlanmış olan dilüsyonlardan 0.5 ml Chromocult Tyrptone Bile X-glucuronide Agara (Oxoid CM0945, USA) yayma yöntemine göre ekilmiştir. Ekim yapılan petripler önce hücreleri canlandırmak amacıyla 30 ± 1 °C'de 4 ± 1 saat bekletilmiş ve daha sonra 44 ± 1 °C'de 18 ± 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında besiyerindeki mavi-yeşil renkli koloniler *E. coli* olarak değerlendirilmiştir (24). *Enterobacteriaceae* aranması için hazırlanan dilüsyonlardan 2 steril petri kabına 1'er ml konulmuştur. VRBGA (Violet Red Bile Glukoz Agar (Oxoid CM1082, USA) 45 °C'ye soğutulmuş dökülüp karıştırılmıştır. Sonra ikinci kat VRBGA dökülerek 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonuç olarak petriplerdeki menekşemsi zon oluşturan tipik koloniler sayılarak, seçilen kolonilere oksidaz testi uygulanmıştır (25). *Pseudomonas* spp. sayımında Cetrimide (Oxoid SR0102, USA) ilaveli *Pseudomonas* Agar Base (Oxoid CM0559, USA) kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan ekimi yapılan petripler 25 ± 1 °C'de 48 saat inkübe edilerek değerlendirilmiştir (26). Mikrobiyolojik analizler iki tekrerrür olacak şekilde yapılmıştır.

BULGULAR

Örneklerde yapılan analizler neticesinde TAMB sayısı 2.30-6.30 log KOB/g (2.0×10^2 - 2.0×10^6 KOB/g), *E. coli* örneklerin çoğunda (32 örnek %80) tespit edilemezken, 8 örnekte (%20), 2.50-2.95 log KOB/g (3.2×10^2 - 9.0×10^2 KOB/g) düzeyinde saptanmıştır. İncelenen surimi örneklerinde enterobakterler 3.0-3.30 log KOB/g (1.0×10^3 - 2.0×10^3 KOB/g) ve *Pseudomonas* spp. sayısı 2.69-3.47 log KOB/g (5.0×10^2 - 3.0×10^3 KOB/g) düzeyinde tespit edilmiştir. Örneklerin 11'inde (%27.5) bakteriler tespit limitinin altında kalmıştır (<10 KOB/g). Bakteri tespit edilen örneklerin sonuçları ve sonuçların standart sapması Tablo 1'de verilmiştir. Ürünlerin genel hijyenik düzeyinin düşük olduğu ve kontaminasyonun varlığı ortaya konulmuştur.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Surimi değışik yerlerden avlanan farklı tür balıklardan yapıldığından bakteri florasında çeşitlilik olabilmektedir (14). Diğer yandan balıkların dokusu işleme sırasında kolayca zedelenildiğinden mikrobiyal bulaşmaya açıktır (27). Bu mikroorganizmalar suriminin bozulmasına sebep olabileceği gibi halk sağlığını da tehdit edebilirler (11, 19). Araştırmamızda surimi örnekleri TAMB, *E. coli*, *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* spp. yönünden incelenmiştir. Örneklerin 29'unda (%72.5) bakteri tespit edilmiştir. Bununla beraber TGK Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nde araştırılan bakteriler açısından herhangi bir değer bulunmamaktadır (28).

Liu ve ark. (29), tarafından surimilerin başlangıç toplam bakteri sayısının 4.4 log KOB/g olduğu ve -1 °C'de 35 gün depolama sonunda bu sayısının 7.2 log KOB/g çıktığı bildirilmiştir. Coton ve ark. (7), surimi örneklerinin %98'inde başlangıç toplam aerobik mezofilik bakteri sayısını $<10^2$ KOB/g düzeyinde tespit etmişler. Soğuk depoya aldıkları örneklerin raf ömrü sonunda %50'sinin $<10^2$ KOB/g, %10'nun 10^2 - 10^3 KOB/g, geri kalan %40'nın ise 10^3 KOB/g'dan fazla olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmamız kapsamında incelediğimiz örneklerde en fazla 6,3 log KOB/g TAMB tespit edilmiştir. Ayrıca örneklerin %27.5'i (11 adet) tespit limitinin altında kalmış, %32.5'i (13 adet) 10^2 - 10^3 KOB/g, geri kalan 16 (%40) örnekte ise 3 log KOB/g düzeyinde toplam aerobik mezofilik bakteri belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre belirlenen bakteri yoğunluğu ürünün raf ömrünü kısaltacak ve halk sağlığını etkileyecek boyutlara gelebilir. Tespit limitinin altında kalan örneklerde az da olsa benzer bir riskin olduğu düşünülmektedir.

Shaviklo ve Rafipour (17), surimi üretiminde kullanacakları balık kıymasındaki toplam bakteri miktarının 7.1×10^5 KOB/g düzeyinde tespit ettiklerini, bununla sebebinin balığın bağırsağından kaynaklanan kontaminasyon olabileceğini belirtmişlerdir. Ancak etkili bir süzme işleminden sonra bu değerin 3.1×10^3 KOB/g düzeyine düştüğünü, aynı işlem sonunda elde edilen surimilerde *Salmonella* ve *E. coli*'nin bulunmadığını, çok düşük sayıda koliform (<10 KOB/g), *Staphylococcus aureus* (<100 KOB/g), maya ve küf (<10 KOB/g) tespit edildiğini bildirmişlerdir. Surimi işlemede kullanılan klorlu su (10 ppm) mikrobiyal kontrolü sağlasa da üretim aşamalarında elle müdahale çok olduğu için mikrobiyal bulaşmalar olabilmektedir (30). Çapraz bulaşmanın önemli bir göstergesi olan *E. coli* araştırmamızdaki örneklerin 8'inde (%20), enterobakter ise 10'unda (%25) tespit edilmiştir. Soğukta veya dondurularak muhafaza edilen gıdalarda indikatör bakterilerin varlığı üretim hijyenin eksikliğini göstermektedir.

Suriminin mikrobiyal kalitesine mevsim, kaynak, kalite ve işleme prosedürleri etki etmektedir (31). Himelbloom ve ark. (31), surimi örneklerinde toplam canlı sayısını 1.9×10^5 KOB/g olarak rapor etmişlerdir. Çalışmamızda 7 örnekte (%17.5) $>10^5$ KOB/g TAMB tespit edilmiştir. Araştırmalarda bakterilerin surimi örnekleri arasında düzensiz dağıldığı ve tüketilmeden önce

Tablo 1. Surimi örneklerinin mikrobiyolojik analiz sonuçları (log₁₀ KOB/g, n=40, Ort ± SS).
Table 1. Microbiological analysis results of surimi samples (log₁₀ CFU/g, n=40, Mean ± SD).

Sıra No	Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
1	2.30	2.77	3.0	<1
2	4.70	<1	<1	<1
3	3.64	<1	<1	<1
4	3.79	<1	3.14	<1
5	5.73	<1	<1	<1
6	3.96	<1	<1	2.74
7	4.84	2.50	3.07	<1
8	6.30	2.80	3.30	3.43
9	2.80	<1	<1	3.47
10	4.50	<1	<1	<1
11	5.04	2.72	3.11	<1
12	2.76	<1	<1	<1
13	4.95	<1	<1	2.69
14	2.81	<1	<1	<1
15	2.65	2.89	3.23	<1
16	4.92	<1	<1	<1
17	4.57	2.59	<1	<1
18	3.84	<1	<1	<1
19	4.85	<1	<1	<1
20	2.90	<1	3.27	<1
21	6.17	<1	<1	<1
22	4.59	<1	<1	<1
23	3.83	2.70	3.20	2.95
24	5.20	<1	<1	<1
25	3.66	<1	<1	3.25
26	3.67	2.95	3.20	3.39
27	6.00	<1	<1	<1
28	5.98	<1	3.17	<1
29	4.51	<1	<1	<1
Ortalama ± SS	4.33±1.13	2.74±0.15	3.17±0.09	3.13±0.33

<1 tespit limitinin altı, KOB: Koloni oluşturan birim, CFU: Colony Forming Unit, ORT: Ortalama, SS: Standart Sapma, SD: Standard Deviation

ıslı işleme tabi tutulan surimilerin patojen bakteri içermediği belirtilmiştir (31, 32). Benzer şekilde incelemeye aldığımız örneklerde de bakteri sayılarında düzensizlikler tespit edilmiştir. Bu durumun farklı üretim ve işleme şartlarından kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir. Zhao ve ark. (10), surimilerin 4 °C'de depolanması ile başlangıçta 1,87 log KOB/g olan toplam bakteri sayısının 6. günde 4.73 log KOB/g, 9. günde 4.89 log KOB/g, 12. günde ise 5.17 log KOB/g'a çıktığını, aynı şartlarda *E. coli* sayısının ise sırasıyla 2.01 log KOB/g, 2.44 log KOB/g, 2.84 log KOB/g olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların TAMB sonuçları ile çalışmamızda elde ettiğimiz bazı bulgular uyumludur. *E. coli* açısından değerlendirdiğimizde ise çalışmamızdaki 2.95 log KOB/g ile araştırmacıların 12. günde elde ettiği sonuç (2.84 log KOB/g) yakındır. Çorapçı ve Güneri (33), yengeç surimiden ürettikleri suşinin 1. gün analizinde *E. coli* tespit edemediklerini, TAMB sayısının 3.26 log KOB/g, toplam psikrofil bakteri ve toplam koliform sayısının <10 log

KOB/g olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacıların sonuçları ile çalışmamız bulguları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bunun nedeninin surimilerin farklı bir ürüne işlenirken uygulanan yöntem ve kullanılan katkı maddelerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Yüksek su ve besin içeriğinden dolayı surimiler, depolama sürecinde bakteriyel çoğalma için uygun bir ortam sağlamaktadır. Zhou ve ark. (6), işleme alacakları surimilerde başlangıç toplam aerobik bakteri sayısının 10³-10⁴ KOB/g, enterobakter sayısının ise tespit limitinin altında kaldığını 48 saatlik fermentasyon sonunda sayının sırasıyla 10⁸ ve 10⁴ KOB/g olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmamızdaki sonuçların bir kısmı (16/29), araştırmacıların başlangıçta tespit ettikleri toplam bakteri sayısı ile uyum içerisindedir. Elde ettiğimiz enterobakter sayısı araştırmacıların çiğ örnekte bildirdiklerinin (<10) çok üstünde olmasına rağmen fermentasyondan sonra sayılan 10⁴ KOB/g

sayısının altında (2.0×10^3 KOB/g) kalmıştır. Üretiminde yaklaşık %2.5 tuz kullanılan surimilerde enterobakter inhibisyonu için tuzlama önemli bir faktördür (2). Ancak hazırlanmasında az tuz kullanılan ya da kullanılmayan surimilerin bu bakteri açısından risk teşkil edebileceği düşünülmektedir.

Şen ve ark. (34), surimi üretimi için 4 ay donmuş olarak depolanan mezgit ve sardalya balıklarından elde ettikleri kıymaları bakteriyolojik olarak incelemişler ve toplam mezofilik bakteri sayısının mezgit kıymasında $3,4 \times 10^5$ KOB/g, sardalya kıymasında $1,5 \times 10^5$ KOB/g aynı sırayla psikrofil bakteri sayısını $4,5 \times 10^5$ ve $2,5 \times 10^5$ KOB/g, koliform sayısını 120 EMS/g ve 120 EMS/g, fekal koliform sayısını her iki örnekte de <3 EMS/g, *S. aureus* sayısını <100 KOB/g olarak tespit etmişlerdir. Benzer şekilde incelediğimiz örneklerin 15'inde (%37.5) en az iki bakteri tespit etmiş olmamız surimilerin aynı anda birçok bakteriyle kontamine olabileceğini ortaya koymaktadır.

Surimilerin dondurularak (-18 °C) depolanması gerekir. Ancak dondurulduktan sonra çözündürülmesi biyolojik değerliğinde azalmaya sebep olabilmektedir (35). Bu yüzden soğuk muhafaza da tercih edilebilmektedir. Dinçer ve ark. (36), mezgit etinden ürettikleri surimilerden yaptıkları sosislerin $+4$ °C'de 15 gün depolandığında bozulduğunu ancak depolama boyunca patojen bakteri (*S. aureus*) tespit edemediklerini belirtmişlerdir. Depolama süresince ortama hakim olan psikrofil bakteriler *S. aureus*'ü baskılamış olabilir. Bazı örneklerimizdeki *E. coli*, *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* spp. bulguları (örn: Tablo 1'deki 2., 5., 21. ve 29. sıradakiler) araştırmacıların sonuçlarını destekler niteliktedir. Bakteri inhibisyonu sağlayan esansiyel yağların (37) kullanılmasıyla surimilerin raf ömrü uzatılabilir.

Sonuç olarak, incelediğimiz surimi örneklerinde halk sağlığı yönünden tehdit oluşturabilecek bakterilere rastlanılmıştır. Surimiler birçok bakteri gelişmesi için uygun besi ortamıdır. Örneklerin 11'inde bakteri sayısı tespit limitinin (<1 log KOB/g) altında kalmıştır. Önemli bir kontaminasyon belirteci olan *E. coli* 8 örnekte ortalama 2.74 ± 0.15 log KOB/g düzeyinde bulunmuştur. Surimilerin üretim, depolama ve servis aşamalarında soğuk zincirin kırılmamasına dikkat edilmelidir. Bu aşamalarda hijyen eğitimi almış kişilerin görevlendirilmesi halk sağlığını korumaya katkı sağlayacaktır. Ayrıca nitelikli ham maddenin seçiminin ürün raf ömrüne etki ettiği unutulmamalıdır. Elde edilen sonuçların deniz ürünleri üretimi ve işlenmesinde potansiyel kontaminasyonu önlemek için alınacak tedbirlere katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Genel olarak su ürünlerindeki risklerin ortaya konulması açısından resmi kurumlarca denetim ve kontrollerin artırılması ve yeni araştırmaların yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). With Jan.-Sep. 2018 Statistics. The GLOBEFISH Highlights, 2019;1:26.
2. Hall GM. Fish Processing-Sustainability and New Opportunities, 1st ed. West Sussex: Blackwell Publishing; 2011. p. 98-99.
3. Ercoşkun H. Surimi: Balık jel ürünleri. GMO Gıda Mühendisliği Derg. 2003;7:22-28.
4. Lee CM. Surimi: Science and Technology. In: "Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology", Ed; Francis FJ, 2nd ed. New York: John Wiley and Sons; 1999. p. 2229-39.
5. Minh NP, Pham VT, Hoang DTM, Dung NC, Mai STA. Surimi production from mud carp (*Henicorhynchus siamensis*). J Pharm Sci & Res Vol. 2019;11:1373-1376.
6. Zhou X, Zhao D, Liu J, Lu F, Ding Y. Physical, chemical

and microbiological characteristics of fermented surimi with *Actinomucor elegans*. LWT-Food Sci Technol. 2014;59:335-341.

7. Coton M, Denis C, Cadot P, Coton E. Biodiversity and characterization of aerobic spore-forming bacteria in surimi seafood products. Food Microbiol. 2011;28:252-260.
8. King NJ, Whyte R, Hudson JA. Presence and significance of *Bacillus cereus* in dehydrated potato products. J Food Prot. 2007;70:514-520.
9. Turan H, Sönmez G. Changes in the quality of surimi made from thornback ray (*Raja clavata*, L. 1758) during frozen storage. Int J Food Sci Nutr. 2007;58:557-566.
10. Zhao Y, Kong H, Zhang X, Hu X, Wang M. The effect of Perilla (*Perilla frutescens*) leaf extracts on the quality of surimi fish balls. Food Sci Nutr. 2019;7:2083-2090.
11. González D, Vitas AI, Díez-Leturia M, García-Jalón I. 2013: *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood in Spain: Study of prevalence and temperatures at retail. Food Microbiol. 2013;36:374-378.
12. Hollingworth TA, Kaysner CA, Colburn KG, Sullivan JJ, Abeyta C, Walker, KD, et al. Chemical and microbiological analysis of vacuum-packed, pasteurized flaked imitation crabmeat. J Food Sci. 1991;56:164-167.
13. Skara T, Valdramidis VP, Rosnes JT, Noriega E, Jan FM, et al. A novel model to assess the efficacy of steam surface pasteurization of cooked surimi gels inoculated with realistic levels of *Listeria innocua*. Food Microbiol. 2014;44:64-70.
14. Tsuda K, Nagano H, Ando A, Shima J, Ogawa J. Isolation and characterization of psychrotolerant endospore-forming *Sporosarcina* species associated with minced fish meat (surimi). Int J Food Microbiol. 2015;199:15-22.
15. Zhao D, Lyu F, Liu S, Zhang J, Ding Y, Chen W, et al. Involvement of bacterial quorum sensing signals in spoilage potential of *Aeromonas veronii* bv. *veronii* isolated from fermented surimi. J Food Biochem. 2018;42:1-11.
16. Bruijn I, Liu Y, Wiegertjes GF, Raaijmakers JM. Exploring fish microbial communities to mitigate emerging diseases in aquaculture. FEMS Microbiol Ecol. 2018;94:1-11.
17. Shaviklo AR, Rafipour F. Surimi and surimi seafood from whole ungutted myctophid mince. LWT-Food Sci Technol. 2013;54:463-468.
18. El-Kholie EM, Abdelreheem MAT, Khader SA. Utilization of common carp fish surimi in baby food products. Afr J Agric Res. 2014;9:2332-2338.
19. Ariyawansa S, Ginigaddarage P, Jinadasa K, Chandrika JM, Arachchi GG, Ariyaratne S. Assessment of microbiological and bio-chemical quality of fish in a supply chain in Negombo, Sri Lanka. Procedia Food Sci. 2016;6:246-252.
20. Saritha K, Immaculate Jeyasanta K, Patterson J. Quality of tomato hind fish (*Cephalopholis sonnerati*) at different stages of post harvest processing. Int J Res Medical and Health Sci. 2014;4:30-42.
21. Adeshina I, Abdulwahab M, Adewale YA, Suleman SB, Tiamiyu LO. Detection of *Listeria monocytogenes* in fried fish, processing slab and tools in Kwara State, Nigeria. Harran Univ Vet Fak Derg. 2017;6:32-37.
22. Nout MJR, Aidoo KE. Asian fungal fermented food. In the mycota. Vol X "Industrial applications", Ed; Hofrichter M. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin; 2010. p. 29-53.

23. International organization for standardization ISO 4833. Microbiology-general guidance for the enumeration of micro-organisms-colony count technique at 30 °C. 2013.
24. International Organization for Standardization (ISO) 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. 2001.
25. International Organization for Standardization (ISO) 21528-2: 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*-Part 2: Colony-count method. 2004.
26. Mendes R, Silva HA, Anacleto P, Cardoso C. Effect of CO₂ dissolution on the shelf life of ready-to-eat *Octopus vulgaris*. *Innov Food Sci Emerg*. 2011;12:551-561.
27. JingHao C, Han S, BingDi M, ShaoXiao Z, KaiBo D, BaoDong Z, et al. Research progress on quality control technology of surimi products. *Food Research Develop*. 2019;40:200-206.
28. TGK. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. 29 Aralık 2011/ Resmî Gazete Sayısı: 28157. 2011
29. Liu Q, Kong B, Han J, Chen Q, Xueying H. Effects of superchilling and cryoprotectants on the quality of common carp (*Cyprinus carpio*) surimi: Microbial growth, oxidation, and physicochemical properties. *LWT-Food Sci Technol*. 2014;57:165-171.
30. AFDF. HACCP guidelines for the U.S. surimi industry. Alaska Fisheries Development Foundation, Final report. Seattle, WA: Manning, Batson, & Associates, Inc., USA, 1989. p. 149.
31. Himelbloom BH, Brown EK, Lee JS. Microbiological profiling of surimi productions. Anchorage, AK: Alaska Fisheries Development Foundation. Final Report. Anchorage, USA. 1989. p. 1-13.
32. Su Y, Daeschel MA, Frazier J, Jaczynski J. Microbiology and pasteurization of surimi seafood. In "Surimi and surimi seafood", Ed; Park JW. New York: Marcel Dekker Inc.; 2005. p. 583-590.
33. Çorapçı B, Güneri N. Yengeç, istakoz surimi ve fûme somon ile hazırlanmış makizusunun 4 ±1°C'de duyusal, kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesi. *J Food Health Sci*. 2016;2:159-170.
34. Şen EB, Çaklı Ş, Kılınç B. Dondurulmuş mezgit ve sardalyadan üretilen surimi ve surimi jellerinin kalite parametrelerindeki değişimler. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2017;34:81-91.
35. Castrillon AM, Alvarez Pontes E, Arias MTG, Navarro P. Influence of frozen storage and defrosting on the chemical and nutritional quality of sardine (*Clupea pilchardus*). *J Sci Food Agric*. 1996;70:29-34.
36. Dinçer T, Yılmaz EBS, Çaklı Ş. Determination of quality changes of fish sausage produced from saithe (*Pollachius virens* L., 1758) during cold storage. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2017;34:391-399.
37. Kong H, Zhou B, Hu X, Wang X, Wang M. Protective effect of Perilla (*Perilla frutescens*) leaf essential oil on the quality of a surimi-based food. *J Food Process Preserv*. 2018;42:1-8.

Bir köpekte gebeliği sonlandırmak için kullanılan Aglepriston (RU 46534), sonraki östrus sikluslarını ve meme bezi büyümesini etkiler mi?

Tuğra AKKUŞ¹

¹Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa/TÜRKİYE

Anahtar Kelimeler:

yalancı gebelik
aglepriston
östrus siklusu
meme bezi
köpek

Key Words:

pseudopregnancy
aglepristone
estrus cycle
mammary gland
dog

Received: 08.09.2019

Accepted: 28.01.2020

Published Online: 30.04.2020

Article Code: 617006

Sorumlu Yazar:

T.AKKUŞ

(tuğraakkus08@hotmail.com)

ORCID:

T. AKKUS: 0000-0002-6002-5942

ÖZ

Bu olguda Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesine getirilen 22 aylık Labrador Retriever ırkı köpekte uzun süren meme bezlerinde şişlik olgusunun klinik ve laboratuvar bulguları eşliğinde aydınlatılması sunulmuştur. Anamnezde östrus belirtilerinin üzerinden dört ay geçmesine rağmen devam eden meme bezlerinin büyüklüğü ve bir önceki östrusunda gebe kalıp gebeliği sonlandırmak için aglepriston uygulandığı bilgisi alındı. Fiziki muayenede meme bezlerinin kranialden kaudale artan ölçüde normale göre hiperplazik olduğu tespit edildi. Palpasyonda meme bezlerinin yumuşak kıvamlı ve meme başlarından süt geldiği görüldü. Meme bezi ultrasonografisi ve akciğer radyografisinde patolojik bir durumla karşılaşılmadı. Kan serum prolaktin ve progesteron ölçümleri kaydedildi. Klinik ve laboratuvar bulguları doğrultusunda yalancı gebelik teşhisi konularak kabergolin ve papatya çayı ile tedavisi yapıldı. Hasta bir yıl boyunca yapılan seksüel siklus takiplerinde aynı şekilde ve sürelerde meme bezinde tekrarlayan büyümeler meydana geldiği izlendi. Tedavi ve takipler süresince meme bezlerinde makroskopik herhangi bir kitle veya olumsuz durum gözlenmedi. Sonuç olarak, hormonal gelişim tam oturmadan erken yaşta yapılan gebeliği sonlandırmak için kullanılan ekzojen ajanlardan biri olan aglepristonun, köpeklerin sonraki seksüel sikluslarında düzensizlikler ve meme bezlerinde birtakım sorunlara neden olarak, bozulan hormonal dengenin ileride çeşitli rahatsızlıklara predispozisyon oluşturabileceği şüphesini oluşturmuştur.

Does Aglepriston (RU 46534) used to end pregnancy in a dog affect subsequent estrus cycles and mammary gland enlargement?

ABSTRACT

In this case, pre/postoperatively clinical and laboratory findings at the case of swelling of a long time mammary glands in 22 month old Labrador Retriever breed bitch were presented Veterinary Faculty Animal Hospital. In the anamnesis, it was learned that the size of the mammary glands although it has been four months since oestrus symptoms and that aglepriston was used to stay pregnant and terminate the pregnancy in the previous oestrus. Physical examination revealed that the mammary glands were hyperplasic from cranial to caudal and increased to normal. Palpation showed that the mammary glands had a soft consistency and milk came from the mammary gland. Mammary gland ultrasonography and lung radiography showed no pathological condition. Blood serum prolactin and progesterone measurements were recorded. According to the clinical and laboratory findings it was diagnosed as pseudopregnancy and treated with cabergoline and daisy tea. Repeated enlargements of the mammary gland were observed in the same manner and durations during the sexual cycle follow-ups performed for one year. No macroscopic mass or adverse condition was observed in mammary glands during treatment and follow-up. In conclusion, aglepriston, one of the exogenous agents used to terminate pregnancy at an early age without hormonal development is suspected of causing disturbances the latter sexual cycles of dogs and some problems in the mammary glands, which may lead to predisposition to various disorders in the future.

GİRİŞ

Köpeklerde başarılı bir çiftleşmenin gerçekleştiği kabul edildiğinde gebeliğin engellenmesi veya sonlandırılması için; östrojenler, prostaglandinler, dopamin agonistleri ve glikokortikoidler yaygın olarak kullanılmaktadır (1,2). İstenmeyen gebeliklerin sonlandırılmasında en güncel yaklaşım, progesteron antagonistlerinin (antiprogesterin, progesteron reseptör blokörleri) uygulanmasıdır (3,4,5). Progesteron antagonistleri, progesteron reseptörlerine bağlanan ve reseptörleri işgal ederek endojen progesteronun etkilerini engelleyen sentetik steroidlerdir(6,7). Mifepriston (RU 38486), aglepriston (RU 46534), onapriston (ZK 98299) üç farklı progesteron antagonistleridir ve hidrofilik zincirleri birbirine benzerlik gösterir(8). Progesteron antagonistleri günümüze kadar çalışılan tüm türlerde gebelikleri sonlandırmaktadır (6,9).

Köpeklerde mifepriston ve aglepriston gebeliği sonlandırmak amacıyla kullanılmıştır. Mifepristonun enjektabl bir analogu olan aglepristone (RU 46534) uterusu bulunan progesteron reseptörlerine, progesterona kıyasla üç kez daha fazla affinite göstererek bağlanır, onları fıkse eder ve progesteron bağlanmasını bu şekilde önlemiş olur. Fransa'da geliştirilen ve Ekim 1996'dan bu yana Alizine® adı altında, köpeklerde gebelik sonlandırılması endikasyonu ile veteriner hekimlik alanında kullanıma sunulmuştur.(3,4,5,9).

Köpekler monoöstrik hayvanlardır. Çoğu ırklar 4-10 ay (ortalama 6-7 ay) aralıklarla östrus gösterir. Seksüel siklusları 4 evrede incelenir (10). Anöstrus süresi ırka bağlı olarak 2-10 ay arasında değişmektedir. Anöstrus sonrası dönem olan proöstrus, 21 güne kadar uzayabilmektedir. Östrus dönemi 2-12 günlük bir süreyi kapsamaktadır (11). Östrustan sonraki dönem diöstrus veya metaöstrus olarak tanımlanmıştır. Metöstrus terimini kullanan yazarlar östrustan sonra 18-20 hafta devam eden ve progesteron değerlerinin yüksek seyretmesi olarak tanımlamışlardır (12). Diğer yazarlar ise diöstrus veya metöstrusu corpus luteum aktivitesine bağlı bir siklus dönemi olarak tanımlamaktadırlar. Bu dönemin 9-12 hafta devam ettiği ortaya koymuşlardır (11).

Bu olguda, ilk östrus siklusunda gebe kalan bir köpeğin gebeliğini sonlandırmak amacıyla kullanılan aglepriston uygulaması sonrası östrus siklus sürelerinin düzensizliği ve meme bezlerinde neden olduğu anormal büyümeler ile yapılan siklus takiplerinde bu durumların tekrarı olgusunun bilgisi sunulmuştur.

OLGU TANIMI

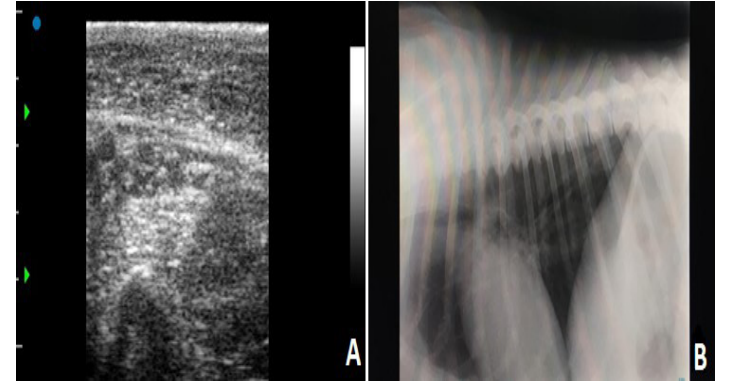
Çalışma materyalini Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesine getirilen ve dış bakıda meme bezlerinde belirgin şişliğe sahip 20 kg ağırlığında, 22 aylık Labrador Retriever ırkı dişi bir köpek oluşturdu. Hastanın anamnezinde hiç doğum yapmadığı, ilk östrusunda (11 ay) çiftleştiği, 1 ay sonra yapılan kontrolde gebelik teşhisi konulduğu ve gebeliği sonlandırmak için aglepriston (Alizin®, Virbac) uygulandığı, uygulama sonrası bir hafta süreyle hayvanda iştahsızlık bulguları gözleendiği, meme bezlerinin büyüdüğü ve sonraki ilk östrusunun erken görüldüğü kaydedildi. Ayrıca iştah ve genel durumun iyi olduğu

bilgisi alındı. Vücut ısısı 38,5°C, nabız ve solunum normaldi. Fiziki muayenede bütün meme bezlerinde şişkinlik olduğu ve bu şişkinliğin arka meme bezlerinde daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 1).



Şekil 1. Meme bezlerinde görülen hiperplazi

Palpasyonda meme bezlerinin yumuşak olduğu, red edilemediği ve içerisinden seröz yapıda süt geldiği belirlendi. Meme bezinin ultrasonografisinde yer yer süt kalsifikasyon ve hiperplazik bez yapısı görüldü, herhangi bir fitik bulgusu oluşturacak duruma rastlanmadı (Şekil 2A). Radyografik muayenede akciğer loblarında makroskobik olarak metastazik odaklar görülmedi (Şekil 2B).



Şekil 2. Meme bezinin ultrason görüntüsü (A), Akciğer radyografik görüntüsü (B).

Laboratuvar incelemelerinde serum prolaktin (16,81 ng/ml) ve serum progesteron (1,12 ng/ml) seviyeleri kaydedildi. Klinik ve laboratuvar bulguları doğrultusunda; östrus üzerinden uzun zaman geçmiş olup hayvanın anöstrusta olması gerekirken hayvana yalancı gebelik teşhisi konuldu. Tedavide kabergolin (Dostinex®,Pfizer) 5µg/kg dozda günde bir kere 1 hafta oral olarak uygulandı. Bunun yanında meme bezlerinde rezolüsyona yardımcı olmak için lokal olarak papatya çayı kompresisi önerildi. Bir hafta sonra yapılan takip ve kontrollerde memedeki şişliğin indiği belirlendi (Şekil 3).

Aynı hayvanın seksüel siklus takibi bir yıl boyunca yapıldı. Bu takiplerde de östrus siklusunun bitiminden 4-5 ay sonrasına kadar aynı şekilde yalancı gebelik belirtilerine rastlandı.



Şekil 3. Tedavi sonrası meme bezi görüntüsü.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Dişi köpeklerde progesteron, endometriyum epitelini implantasyon için hazırlar. Fekondasyon sonrası uterus sekresyonunu kontrol eder, implantasyon gerçekleşene kadar (18-21 gün) embriyonun uterus salgılarıyla beslenmesini sağlar. Ayrıca; gebeliğin 65. gününe kadar, uterus kontraksiyonlarını en düşük seviyede tutar. Progesteronun gebelik üzerindeki bu etkilerinden dolayı istenmeyen gebeliklerin sonlandırılması veya doğumun uyarılması amacıyla, antiprogesteronlar başarıyla kullanılabilir (3,4,5). Aglepriston, çiftleşme gününden başlayarak gebeliğin 45. gününe kadar gebelik sonlandırma amacıyla uygulanabilir ve uygulama protokolü, 24 saat arayla 0.33 ml/kg dozunda iki s.c. enjeksiyon olarak belirtilmiştir. Erken dönem gebeliklerde yapılan uygulamalar, rezorpsiyonla; orta dönem yapılan uygulamalar ise abortla sonuçlanmaktadır (1). Orta dönem gebeliklerde yapılan uygulamalar sonrası, vaginadan mukoid kahverengi bir akıntı gelir. Akıntı görülmesinden 24 saat sonra abort başlar. Abortus süreci yaklaşık 3-5 gün sürer. Bu esnada hayvanda hafif depresyon, anoreksi, meme bezlerinde konjesyon oluşabilir (3,13-15). Sunulan olguda çiftleşmeden bir ay sonra yapılan aglepriston sonrası anamnezle alınan semptomlar literatür verileriyle uyumludur.

Antiprogesteron uyarımı sırasında plazma progesteron seviyesi düşmemektedir. Ancak vücut sıcaklığının düşmesi, servikal kanalın açılması ve doğum davranışlarının görülmesi, normal doğumdan farksız olarak gerçekleştiğini göstermektedir (16). Aglepriston uygulaması sonrası luteal dönem ve interöstrus zamanının kısaldığı (17,18) ayrıca orta dönem gebeliklerde uygulama sonrası 12 saat içinde prolaktin plazma seviyesinde artış olduğu bildirilmiştir (2,3). Son yıllarda aglepriston, kedi ve köpeklerde etiolojisinde progesteronun rol aldığı bazı jinekolojik problemlerin tedavisinde denenmektedir. Bunların başlıcaları; doğumun uyarılması (3,19), kistik endometriyal hiperplazi-pyometra kompleks (7,9,20-22), meme fibroadenomatosisi (23) insülin direnci (25) ve aşırı büyüme hormonu salınımıdır (25). Olguda gebeliğin sonlandırılması amacıyla önceden yapılmış olan aglepriston uygulaması sonrası; interöstrus aralığının kısaldığı, prolaktin artışına bağlı meme bezlerinin büyüdüğü ancak iki ay sonra indiği bilgileri bildirilen çalışmalarla uyumludur.

Aglepriston uygulamasının istenen özelliklerinin yanı sıra

birtakım yan etkileri de belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada, aglepriston uygulanan altı köpekten üçünde enjeksiyon bölgesinde ağrısız yangı semptomları oluşmuş ve belirtiler bir aylık süre sonunda ortadan kalkmıştır (1,14). Aglepriston ile üst üste aynı köpekte iki kez yapılan abort uyarımı sonucunda fertilitenin olumsuz etkilenmediği (26), yapılan diğer çalışmada ise fertilitenin azaldığı ortaya konulmuştur (2). Schäfer-Somi ve ark (27), aglepriston ile iki abort sağlandıktan sonra köpeğin 3 siklus boyunca çiftleştiği ancak gebe kalmadığını belirtmiş ve yapılan ovariohistektomi sonrası kistik endometriyal hiperplazi teşhisi konulmuştur. Pettersson ve Tidholm (14), aglepriston uygulaması sonrası ilk östrusta iki köpekte pyometra, bir köpekte tedavide başarısızlık, diğer köpeklerde ise geçici olarak anoreksi, enjeksiyon bölgesinde lokal reaksiyon, polidipsi ve kilo kaybı görmüşlerdir. Galac ve ark (2), aglepriston tedavisinden 4 hafta sonra uterusun ultrasonografisi ile kistik endometriyal hiperplazi oluştuğunu bildirmişlerdir. Sunulan olguda ise aglepriston uygulaması sonrası östrus siklusu düzensizliklerin döl verimini olumsuz etkileyebileceği ancak olgumuzdaki köpeğin jandarma eğitim köpeği olması nedeniyle çiftleştirme ve gebelik düşünülmemesi dolayısıyla fertilitate değerlendirmesi yapılamamıştır.

Serum progesteron (P4) konsantrasyonları <1.0 ng/mL ile başlayan süre anöstrus olarak tanımlanır. Bazal olarak tanımlanan kesin bir serum P4 konsantrasyonu hala çalışma konusudur. İşlevsel luteal doku, P4 <1.0 ng/mL olduğunda yok sayılır. Anöstrus içindeki köpekler <0.7 ng/mL, genellikle <0.3 ila 0.5 ng/mL serum P4 konsantrasyonlarına sahiptir (28). Anöstrus, uterusun involüsyonu ve siklusun yeniden başlatılmasında önemli bir rol oynar. Doğum yapmamış köpeklerde, endometrial iyileşme östrusun başlamasından yaklaşık 135 gün sonra tamamlanır. Anöstrus ilerledikçe hipotalamik GnRH dalga sayısı ve genliği ile hipofiz ve ovaryuma yanıt verebilirliği artar. (29). Kısa anöstrus, interöstrus aralığının süresini kısaltacaktır, böylece normal endometriyal iyileşmenin tamamlanmasını ve/veya hipotalamus-hipofiz-ovaryum ekseninin normal bağlantısını önleyerek sonraki izleyen dönemde doğurganlığı olumsuz yönde etkileyecektir (30). Sunulan olguda, değerlendirilen hormonal ölçümlerden ve siklus takiplerinden; östrus sonrası dört ay geçmesine rağmen tam ve yeterli bir anöstrus dönemi olmayıp ileriki süreçte genital organlarda sorunlar çıkabileceği düşünülmüştür.

Sunulan raporda genç bir dişi köpekte (22 aylık) aglepriston uygulaması sonrası takip eden ilk östrus siklusundaki düzensizlik ve meme bezlerinde şişkinliğin devam etmesiyle hastanın bir yıllık izleminde de aynı sorunların devam ettiği görülmüştür. Genç yaşlarda ve gebeliği engelleyen aglepriston gibi ekzojen ajanların östrus siklusunda düzensizliğe yol açarak ileriki yaşlarda infertilite nedeni olabileceğini şüphesi uyanmıştır. Aglepristonun seksüel siklus üzerine etkisinin net olarak ortaya konulabilmesi için ilave çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Concannon PW, Yeager A, Frank D, Iyampillai A. Termination of pregnancy and induction of premature luteolysis by the antiprogestagen, mifepristone, in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 1990; 88: 99-104.
2. Galac S, Kooistra HS, Butinar J, Bevers MM, Dieleman SJ, Voorhout G, et al. Termination of mid gestation pregnancy in bitches with aglepristone, P4 receptor antagonists. *Theriogenology* 2000; 53: 941-50.
3. Fieni F, Bruyas JF, Bttut, I. Clinical use of two protocols with a progesterone antagonist aglepristone (RU534) to induce parturition in bitches. *J. Reprod. Fertil.* 2001; 57: 237-42.
4. Ay SS, Aslan S, Önyay F, Kaya D, Koldaş E, Arslan S, et al. Effect of oral misoprostol, alone or in combination with aglepristone, on mid-term pregnancy termination in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* 2019; 21(8): 714-722.
5. Ağaoglu AR, Aslan S, Emre B, Korkmaz Ö, Özdemir Salci ES, Kocamüftüoğlu M, et al. Clinical evaluation of different applications of misoprostol and aglepristone for induction of abortion in bitches. *Theriogenology* 2014; 81: 947-951.
6. Wanke MM, Romagnoli S, Verstegen J, Concannon PW. Pharmacological approaches to pregnancy termination in dogs and cats including the use of prostaglandins, dopamine agonists and dexamethasone. In; Concannon PW, England G, Verstegen J, Linde-Forsberg C, editors. *Recent Advances in Small Animal Reproduction.* Ithaca; New York: 2002. p. 1-11.
7. Gobello C. Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction; A review. *Theriogenology* 2006; 66: 1560-7.
8. Baulieu EE. Contraception and other clinical applications of RU486, and antiprogestone at the receptor. *Science* 1989; 245: 1351-7.
9. Hoffmann B, Schuler G. Receptor blockers-general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Anim Reprod Sci* 2000; 60: 295-312.
10. Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. *Canine and feline theriogenology.* 1st ed. Philadelphia: Saunders; 2001.
11. Concannon PW, Mccan JP, Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil* 1989; 39: 3-25.
12. Olson PN, Nett TM, Bowen RA, Sawyer HR, Niswender GD. Endocrine regulation of the corpus luteum of the bitch as a potential target for altering fertility. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 39: 27-40.
13. Fieni F, Tainturier D, Bruya JF. Etude clinique d'une anti-hormone pour provoquer l'avortement chez la chienne. *Rec Med Vet* 1996; 172: 359-67.
14. Pettersson CH, Tidholm A. Safety and efficacy of mid-term pregnancy termination using aglepristone in dogs. *J Small Anim Pract* 2009; 50: 120-3.
15. Gogny A, Fieni F. Aglepristone; A review on its clinical use in animals. *Theriogenology* 2016; 85(4): 555-66.
16. Corrada Y, Garcia P, de la Sota PE, Huzman M, Landoni MF, Gobello C. Decrease of body temperature after aglepristone treatment in bitches. *Animal Reproduction Science* 2005; 87(3-4): 295-9.
17. Galac S, Kooistra HS, Dieleman SJ, Cestnik V, Okkens AC. Effects of aglepristone, a progesterone receptor antagonist, administered during the early luteal phase in non-pregnant bitches. *Theriogenology* 2004; 62: 494-500.
18. Kanca H, Karakaş K. Effectiveness of Aglepristone at Lower-Than-Standard Doses in Prevention of Pregnancy in Mismatched Bitches. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012; 18 (3): 517-21.
19. Baan M, Taverne MM, Kooistra HS, de Gier J, Dieleman SJ, Okkens AJ. Induction of parturition in the bitch with the progesterone-receptor blocker aglepristone. *Theriogenology* 2005; 63: 1958-72.
20. Träsch K, Wehrend A, Bostedt H. Follow-up examinations of bitches after conservative treatment of pyometra with the antigestagen aglepristone. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2003; 50: 375-9.
21. Fieni F. Clinical evaluation of the use of aglepristone, with or without cloprostenol, to treat cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in bitches. *Theriogenology* 2006; 66: 1550-6.
22. Bhatti SF, Rao NA, Okkens AC, Mol JA, Duchateau L, Ducatelle R, van den Ingh GAM, et al. Role of progesterin-induced mammary-derived growth hormone in the pathogenesis of cystic endometrial hyperplasia in the bitch. *Domest Anim Endocrinol* 2007; 33: 294-312.
23. Wehrend A, Hospes R, Gruber AD. Treatment of feline mammary fibroadenomatous hyperplasia with a progesterone-antagonist. *Vet Rec* 2001; 148: 346-7.
24. Lee WM, Kooistra HS, Mol JA, Dieleman SJ, Okkens AC. Ovariectomy during the luteal phase influences secretion of prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in the bitch. *Theriogenology* 2006; 66: 484-90.
25. Beijerink NJ, Bhatti SF, Okkens AC, Dieleman SJ, Mol JA, Duchateau L, et al. Adenohypophyseal function in bitches treated with medroxyprogesterone acetate. *Domest Anim Endocrinol* 2007; 32: 63-78.
26. Aksoy OA. Aglepriston Ve Aglepriston-Cabergolin Kombinasyonuyla Köpekte Abortun İndüksiyonu, Doktora tezi, T. C. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2007.
27. Schafer-Somi S, Aksoy OA, Beceriklisoy HB, Einspanier A, Hoppen HO, Aslan S. Repeated induction of abortion in bitches and the effect on plasma concentrations of relaxin, progesterone and estradiol-17β. *Theriogenology* 2007; 68: 889-95.
28. Concannon PW. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci.* 2011; 124: 200-10.
29. De Gier J, Kooistra HS, Djajadiningrat-Laanen SC, Dieleman SJ, Okkens AC. Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17beta, progesterone, prolactin,

and alpha-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology*. 2006; 65: 1346-59.

30. O'Connor CL, Schweizer C, Gradil C, Schlafer D, Lopate C, Prociuk U, et al. Trisomy-X with estrous cycle anomalies in two female dogs. *Theriogenology*. 2011; 76: 374-80.

Etiological treatment of protozoer diarrhea in neonatal ruminants

İlker Yusuf AKINCI, Metin Koray ALBAY

Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Burdur/TURKEY

Key Words:

diarrhea
ruminant
cryptosporidiosis
coccidiosis
giardiasis

Received: 28.01.2020
Accepted: 20.03.2020
Published Online: 30.04.2020
Article Code:681052

Correspondence:

MK. ALBAY
(mkalbay@mehmetakif.edu.tr)

ORCID:

İY. AKINCI: 0000-0002-8507-7458
MK. ALBAY: 0000-0003-4141-4181

ABSTRACT

Diarrhea is a multifactorial symptom of infectious agents, nutritional and environmental factors. Although many prevention and treatment strategies have been developed to prevent diarrhea, diarrhea is still one of the most common problems in ruminants. Cryptosporidiosis, coccidiosis and giardiasis in newborns and young ruminants are important protozoer diseases causing diarrhea. Although the symptomatic treatment of neonatal diarrhea is similar, there are differences in the etiologic treatment. In this review, antiprotozoal drugs used in the treatment of cryptosporidiosis, coccidiosis and giardiasis are discussed.

INTRODUCTION

Diarrhea that is caused by infectious or non-infectious factors and is characterized by the removal of large amounts of faeces frequently and watery consistency is a crucial symptom in animals (1). As it is common all over the world, it is one of the main problems for not only cattle and sheep but also goat breeding in our country (2). Diarrhea is mostly observed in calves, lambs and kids through the neonatal period. There are many infectious (bacterial, viral, parasitic, protozoan, fungal) and non-infectious (alimentary, toxic, allergic, etc.) reasons in the etiology of diarrhea (1, 3). Cryptosporidiosis, coccidiosis and giardiasis that cause diarrhea are critical protozoan diseases for newborns. These protozoer diseases cause diarrhea by themselves and/or as mixed infections (4–6). These factors lead to diarrhea by causing abnormal motility, hypersecretion, changes in ion transport and permeability disorders in the intestinal mucosa (1). Metabolic changes owing to neonatal diarrhea and symptomatic treatment of diarrhea are similar, but even so there are differences in etiologic treatment. Despite chemotherapeutic advances, neonatal diarrhea is still progressing with high morbidity and mortality. Furthermore, growth retardation and high treatment costs due to diarrhea cause great losses in the national economy (3, 7).

Cryptosporidiosis Treatment

Cryptosporidium parvum (*C. parvum*) is an intracellular protozoan parasite that causes gastrointestinal disease and diarrhea. Cryptosporidiosis is a vital neonatal infection in calves, lambs and kids with high morbidity (8). The epidemics of diarrhea caused by cryptosporidiosis are encountered in many countries. Deaths caused by cryptosporidiosis, which is an important reason of neonatal diarrhea in our country, cause serious economic losses (9).

The main problem of cryptosporidiosis is the lack of a efficient method or drug for disease prevention and treatment (10). Because oocysts are resistant to environmental conditions and most of the disinfectants (11). More than 200 active substances have been tested against cryptosporidiosis to date (12). Although some of these substances tested have shown promising effects for the treatment of the disease, none of these drugs have completely eliminated the disease or fully got the clinical findings under control. Clinical and parasitological responses to the treatment of the disease vary depending on the immune system of animals, duration of antiprotozoer treatment and the use of other drugs in treatment (10). The drugs used in treatment are shown in Table 1.

Paromomycin, an aminoglycoside derivative, is one of the appropriate antibiotics so as to take *C. parvum* infections under control. Paromomycin shows antiprotozoer effect against the substance by being absorbed in small amounts along the restrictive apical membrane that binds extra cytoplasmic parasites. (10). When paromomycin is used prophylactically at 100 mg/kg in calves and kids for 11 days, it not only reduces the oocyst excretion in the faeces but also shortens the oocyst excretion period (13, 14). However, oocyst excretions can be observed in animals once again right after the use of the drugs is prophylactically over (15). When paromomycin is therapeutically used in lambs at different doses and on different days

Table 1 Drugs used in cryptosporidiosis, doses, application times and routes of administration

Drugs	Dosage/Application time		Administration route
Paromomycin	Treatment	100 mg/kg, once a day, 3-5 days	By adding into drinking water or milk
	Prophylactic	100 mg/kg, once a day, 11 days	
Halofuginone	Treatment	0.1 mg/kg, once a day, 7 days	Oral
	Prophylactic	0.1 mg/kg, once a day, during 7 days after birth	
Azithromycin	Treatment	1500 mg/day, 7 days	Oral
Decoquinate	Treatment	2.5 mg/kg, once a day, 21 days	Oral
Organic acids Activated charcoal	Treatment	Calves; 60 ml, twice a day, 4 days. Lambs and kids; 10 ml, 4 days, twice a day.	By adding into the milk or by directly drinking the solution.
	Prophylactic	Calves; 60 ml/day, 7 days, once a day, during 7 days after birth. Lambs and kids; 10 ml/day, 7 days, once a day, during 7 days after birth.	

(100 mg/kg, 3 per day, 200 mg/kg, 2 per days), it diminishes the oocyst excretion and severity of clinical findings (16). When all these data are taken into consideration, paromomycin can be applied in both prophylaxis and treatment of cryptosporidiosis.

Halofuginone lactate, a derivative of quinazolinone, is an effective antiprotozoal agent against lactate eimeria, theileria and cryptosporidia (17). Halofuginone shows a cryptosporidiotic effect on sporozoite and merozoite stages of *C. parvum* (18). Halofuginone lactate is frequently used in the prophylaxis and treatment of cryptosporidiosis in calves, lambs and kids (18–21). In the study conducted over calves, animals in the treatment group were treated with halofuginone lactate at a dose of 0.1-0.12 mg/kg for 7 days (18, 20, 21). In these studies, the use of halofuginone lactate in reducing oocyst excretion is an appropriate treatment option whereas the efficacy of the active substance in the treatment of diarrhea is controversial. In the studies, because reoccurrence of oocyst excretion of some animals after treatment indicates that halofuginone cannot completely prevent the life cycle of parasite. In addition to this, halofuginone lactate treatment alleviates the clinical findings regarding to cryptosporidiosis and decreases mortality rates in calves (10, 22). Prophylactically use of halofuginone lactate (0.1 mg/kg) in calves during the first 7 days following birth significantly reduces the oocyst excretion rate in animals (22). The use of the active substance in small ruminants at the indicated dose and time decreases the oocyst excretion in the faeces (10). In general, halofuginone lactate can be effectively used in both prophylaxis and treatment of cryptosporidiosis (at a dose of 0.1 mg/kg for 7 days) (19–22).

Decoquinate is an antiprotozoer substance that can be used in the treatment of cryptosporidiosis and toxoplasmosis, especially in coccidiosis (23). It has been reported that the use of decoquinate in experimentally infected calves (2.5 mg/kg, for 21 days from birth) may be effective in treatment (10). However, in another study where decoquinate was used at a dose of 2 mg/kg twice a day for 28 days from birth, it was stated that the active substance had no effect on oocyst excretion or clinical findings (24). In a comparative study conducted about efficacy of halofuginone (0.1 mg/kg) and decoquinate (2-5 mg/kg), it was found that halofuginone significantly reduced the excretion of oocysts compared to decoquinate (25).

Nitazoxanide is a nitratiazole benzamide derivative antiparasitic agent effective against most helminths, bacteria and protozoa. The antiprotozoer effect of nitazoxanide is different from its antibacterial effect. The antiprotozoer effect on *C. parvum* is thought to be similar to its effect on *Neospora caninum* (*N. Caninum*). After taking nitazoxanide by an oral way, it turns into an active metabolite tizoxanide by being hydrolyzed (10). In vitro, it was determined that nitazoxanide inhibited *N. caninum* protein disulfide isomerase enzyme and restrained the metabolic activity of the parasite in *N. caninum* (26). Nitazoxanide is applied for the treatment of cryptosporidiosis in AIDS patients along with anti-retroviral therapy in humans. There is little information about its effect against cryptosporidiosis in animals (10). In a study where nitazoxanide was used for treatment and prophylaxis in calves (twice a day by adding 15 mg/kg milk to body weight), it was reported that the active substance had no effect on oocyst excretion (27). In another study, however, it was reported that when nitazoxanide was used in calves (1.5 g, twice a day, 5 days), the oocyst excretion period was shortened and fecal consistency arranged (28).

Azithromycin is a macrolide antibiotic used for immunocompromised humans and the treatment of cryptosporidiosis in animals. Thanks to azithromycin treatment, oocyst excretion was suppressed in naturally infected calves (1500 mg/day, 7 days) and it was reported to contribute to clinical recovery (29). However, azithromycin is an expensive active substance and there are not enough studies to evaluate the efficacy of the drugs for the disease (10).

Activated charcoal used along with organic acids obtained by distillation and putrefication from tree barks can be used for the protection and treatment of cryptosporidiosis (30). While activated charcoal affects normal flora very few in the intestinal system, it contributes to the reduction of the number of oocyst by adsorbing oocyst of *Cryptosporidium spp.* On the contrary, organic acids reduce the number of oocyst by aiming at replacing disinfectants against *C. parvum* oocyst. It is also thought that organic acids have an inhibitory effect on the development of active substances. It has been reported that oocyst excretion in animals has reduced by oral administration of activated charcoal containing organic acids to calves (10 g solution with milk substitute feed, at intervals of 8 hours for 4 days) experimentally infected with *C. parvum* (31). In another study, it was reported that oocyst excretion reduced and cli-

Table 2 Drugs used in coccidiosis, doses, application time and routes of administration

Drugs	Dosage/Application time		Administration route
Sulfamethazine	Treatment	140 mg/kg, once a day, 3 days.	Oral
Sulfaquinoxaline	Treatment	60 mg/kg, once a day, 4 days.	Oral
Sulfadimethoxin	Treatment	First day 55 mg/kg as a half dose in the following days, once a day, 4 days.	Oral
Sulfathiazol	Treatment	150 mg/kg, 3-6 days.	Oral
Amprolium	Treatment	Calves; 10 mg/kg, once a day, 5 days. Lambs; 50 mg/kg, once a day, 5 days. Kids; 100 mg/kg, once a day, 4 days.	By adding to drinking water
	Prophylactic	Calves; 5 mg/kg, once a day, 3 weeks. Lambs; 50 mg/kg, once a day, 3 weeks.	
Decoquinate	Prophylactic	0.5-1 mg/kg, at least 28 days.	By adding to feed
Toltrazuril	Treatment	Calves; 5 mg/kg, single dose. Lambs and kids; 20 mg/kg, single dose.	Oral
	Prophylactic	Same as treatment doses.	
Diclazuril	Prophylactic	1 mg/kg, single dose.	Oral

nical findings improved when mixtures (2-3 times a day, 3.75 g/day dose, as a suspension in the milk substitute feed) was provided to the kids aged 3-17 days (30).

It has been reported that oral bovine serum concentrate used for passive immunotherapy reduces oocyst excretion in calves and reduces the severity of clinical symptoms. (5 days at 57 g/day in added milk replacer, 2 days at 57 g/day by blending with rehydration liquid). Three potential different mechanisms have been proposed for the efficacy of bovine serum concentrate in reducing the severity of cryptosporidiosis. The first possible mechanism of effects is that immunoglobulins in oral bovine serum concentrate may cause a decrease in the number of parasites over the intestinal system. The second possible mechanism is that growth factors in bovine serum increase the repair of intestinal cells. The third possible mechanism is that bovine serum concentrate may reduce the invasion and replication of the parasite in reducing the severity of infection (32).

Coccidiosis Treatment

Coccidiosis is a protozoal infection caused by coccidia parasites of the *Eimeria* genus, leading to diarrhea by affecting particularly young ruminants (33). As a result of intracellular growth and proliferation of the active substances, the damage in the intestinal cells and mucosa occurs. Mortality, growth retardation and veterinary expenses are among the economic damages of the disease to livestock (33, 34).

In a herd, managing economy can be successfully accomplished in coccidiosis after obtaining detailed information and management principles about the disease. Unless such information is observed, systematic treatments are not appropriate. Preventive measures are the key to controlling coccidiosis. Effective methods for disease prevention involves minimizing theme of susceptible young animals with infective oocyst and administration of coccidiostatic drugs prophylactically injected to animals during agamous developmental stages of the parasites. After the oocysts are transferred to the intracellular form, the effects of drugs on the parasites are limited (33-35).

Anticoccidial drugs have different modes of action on the

endogenous phase of the life cycle of eimeria species (33). Sulfanomides, amprolium and decoquinate parasites make an effective impression in the early stages of life cycle (33, 36). Toltrazuril and diclazuril are molecules that are effective in all stages of life cycles of coccidia. These active substances can be used both in the treatment of the disease and prophylaxis of the disease (33). The active substances used in coccidiosis are shown in Table 2.

Sulfanomides are fundamentally effective on the agamous growth phase of the parasites. Sulfanomides are frequently carried out in treatment, but still they do not have sufficient effect on gamonts. However, sulfanomides are effective in controlling secondary bacterial infections in cases of coccidiosis (36). Sulfaquinoxaline, sulfamethazine, sulfadimethoxine and sulfathiazole are sulfanomide derivatives implemented in the treatment of coccidiosis. There is a risk of toxication due to long term use or overdose of sulfanomides (37).

The structures that amprolium targets are meronts. This active substance has low toxicity and is conducted by adding to drinking water of animals throughout 3-5 days (36). Amprolium is recommended to be used for 10 days in cattle, at 50-62.5 mg/kg for sheep through 5 days, and at 100 mg/kg in 4 days for goats. Given that amprolium is an antagonist of vitamin B1, it should not be used for a long time and vitamin B1 supplements must be implemented. In spite of hygienic measures, amprolium can be orally used for 3 weeks by adding 5-10 mg/kg milk or drinking water as long as outbreaks of coccidiosis cannot be prevented in the herd (37, 38).

Decoquinate is used as anticoccidial drugs that are injected into the feed in many countries. Long-term use is recommended as decoquinate coccidia is effective in only initial phases of the life cycle (36). It was determined that oocyst excretion decreased when 0.5-1 mg/kg decoquinate was injected to the rations of experimentally infected calves. Furthermore, It is reported that decoquinate positively contributes to the growth rate of calves. As a result, when decoquinate is implemented by adding 0.5-1 mg/kg dose to the animal feed, it successfully suppresses the formation of oocyst and prevents cases of coccidiosis (39).

Table 3 Drugs used in giardiasis, doses, application time and routes of administration

Drugs	Dosage/Application time		Administration route
Albendazole	Treatment	20 mg/kg, once a day, 3 days.	Oral
	Prophylactic	Calves, 5 mg/kg, once a day, at 27 days interval, 3 times.	
Fenbendazole	Treatment	10 mg/kg, once a day, 3 days.	Oral
Paromomycin	Treatment	50-75 mg/kg, once a day, 5 days.	Oral
Dimetridazole	Treatment	Calves; 50 mg/kg, once a day, 5 days.	Oral
Secnidazole	Treatment	Calves; 30-400 mg/kg, single dose.	Oral
		Lambs; 10 mg/kg, single dose.	

Benzene acetonitrile compounds (toltrazuril, diclazuril) are effective against all stages of development in the life cycle of eimeria. These compounds are suitable for both treatment and prophylactic use (33). The single use of toltrazuril at a dose of 15 mg/kg decreases oocyst excretion and provides clinical findings improvement in infections caused by *Eimeria bovis* (*E. bovis*) and *Eimeria zuernii* (*E. zuernii*) for calves (40). It was reported that coccidiosis could be under control by using a single dose 1 week before the emergence of expected outbreaks. Toltrazuril dose rate that will be implemented to kids is recommended to be double dose rate approximately rather than the dose which is going to be conducted to cattle and sheep (33). It was stated that the cases of coccidiosis attached to *E. bovis* and *E. zuernii* was prevented thanks to administration of diclazuril prophylactically at a dose of 1 mg/kg with single dose (36).

The regular use of anticoccidial drugs in the poultry sector has provided eimeria species develop resistance to these drugs. However, it is not certain whether eimeria species will develop resistance to anticoccidial treatment in cattle or not, it should be remembered that a potential risk may occur (36).

Giardiasis Treatment

Giardiasis is an important infection arose from *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*), which is an intestinal protozoan with flagella, causing diarrhea, weight loss and lethargy in farm animals (8, 11, 39). It is one of the most common parasites causing loss of yield in ruminants. Most mammals are susceptible to infections caused by *G. intestinalis* (11).

Many active substances are known to be effective against giardia. However, no drug has been licensed to use in the giardiasis treatment for ruminants nowadays (41). The active substances used in giardiasis are shown in Table 3.

Nitroimidazoles such as metronidazole, tinidazole, quinacrine or furazolidine are extensively used in the treatment of giardiasis for humans. In veterinary medical science, metronidazole and secnidazole are used in pet animals, calves and lambs (39, 42). It has been reported that the administration of a single dose of secnidazole, a nitroimidazole derivative in lambs and calves, significantly reduces cyst excretion (42, 43). Volpato et al. reported that secnidazole, which was administered as a single dose (400 mg/kg) in calves, treated giardiasis and that drug continued the efficiency for 30 days (43). Besides, Toros and Ural reported that secnidazole administered at a single dose of 30 mg/kg in calves resets cyst excretion (44).

Benzimidazoles, extensive-spectrum antihelmintics, are other compounds used in the treatment of giardiasis. Benzimi-

dazoles have a high safety margin and selective toxicity (41). In vitro studies, it has been reported that benzimidazoles are more effective on giardiasis than metronidazole and tinidazole (41,45,46). Benzimidazoles affect tubulin polymerization, an important component of cell skeletal structures of giardia trophozoites. In this way, all functional activities of the tubulin structures such as median line and ventral disc are limited. In conclusion, benzimidazoles prevent trophozoites from attaching to intestinal mucosa and colonization (14). Fenbendazole and albendazole reduce cyst excretion in calves (41,47,48). Fenbendazole, provides regeneration in the clinical appearance of the disease by reducing the duration and peak level of cyst excretion (41,49). The doses of benzimidazoles required for giardiasis treatment are higher than those used in antihelminthic treatment (41). When albendazole is used 20 mg/kg for 3 days and fenbendazole is used at 10 mg/kg for 3 days, it is quite effective to eliminate the infection (39, 42, 50). Since the duration of treatment is more important than the doses in the prophylaxis of the disease, it is recommended that benzimidazoles be administered in small doses and at frequent intervals in the studies (47, 49).

Paromomycin *Cryptosporidium spp.*, regarded as effective against protozoan parasites such as a broad-spectrum, is an aminoglycoside derivative antibiotic (10). Paromomycin, by being attached to the small subunit of rRNA, inhibits protein synthesis which has a direct effect on giardia (41). The active substances showing poor absorption from the gastro-intestinal system is well tolerated by calves (15). In experimentally infected calves (50-75 mg/kg/day for 5 days) it was determined that paromomycin reduces cyst excretion effectively (41). In a study examining the efficacy of albendazole and paromomycin on the disease in lambs with giardiasis, it was stated that paromomycin implemented at a dose of 100 mg/kg/day for 3 days was more effective than albendazole (50).

Drugs used in the treatment of giardiasis are effective against giardia, but cyst excretions can be observed in animals within 2-3 weeks after treatment. Since giardia cysts can survive up to 1 week in faeces and up to 7 weeks in soil, the action time of most active substances may be insufficient to protect animals from re-infections (14). The studies emphasize the importance of establishing a combined control program that includes cleaning, disinfection and treatment protocols of animals in order to minimize re-infections after treatment (11, 41).

CONCLUSION

The complete treatment depending on the cause in diarrhea which causes great harm to the economy of our country is the most important factor affecting the success of treatment. It is required to be performed at appropriate dose and time throu-

gh appropriate drug selection in order to eliminate not only the infection but the risks of re-infection as well. This study, which we think that it will be the current reference guide for veterinary practioner, will also provide positive contributions to the protection of herd health.

REFERENCES

- Özkan C, Akgül Y. Neonatal İshalli Buzagalarda Hematolojik, Biyokimyasal ve Elektrokardiyografik Bulgular. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet Fakültesi Derg. 2004;15(1):123-9.
- Savaş T. Oğlak Büyütme: Sorunlu Noktalar Üzerinde Bir Değerlendirme. 2007;48(1):44-53.
- Aydoğdu U. Kuzularda Neonatal Mortalite. Cumhuriyet Üniv Sağ Bil Enst Derg. 2016;2(1):37-46.
- Altuğ N, Yüksek N, Özkan C, Keleş İ, Başbuğan Y. Neonatal Buzagi İshallerinin İmmunokromotografik Test Kitleri İle Hızlı Etiyolojik Teşhisi. YYU Vet Fak Derg. 2013;24(3):123-8.
- Göz Y, Altuğ N, Yüksek N, Özkan C. Parasites detected in neonatal and young calves with diarrhoea. Bull Vet Inst Pulawy. 2006;50(3):345-8.
- Ozidal N, Tanritanir P, Goz Y, Deger S, Kozat S. Parasitic protozoans (Eimeria, Giardia, and Cryptosporidium) in lambs with diarrhoea in the van province (Turkey). Bull Vet Inst Pulawy. 2009;53(1):47-51.
- Al M, Balıkcı E. Neonatal ishallerde rotavirus, coronavirus, E. coli K99 ve Cryptosporidium parvum'un hızlı test kitleri ile teşhisi ve enteropatojen ile maternal immünite ilişkisi. FÜ Sağ Bil Vet Derg. 2012;26(2):73-8.
- Sahinduran, S. Protozoan diseases in farm ruminants. In A Bird's Eye View of Veterinary Medicine. 2012. In Tech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/a-bird-s-eye-view-of-veterinary-medicine/protozoan-diseases-in-farm-ruminants>
- Sevinç F. Ruminantlarda Cryptosporidiosis. Vet Bil Deg. 2004;4:79-84
- Shahiduzzaman M, Daugšchies A. Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. Vet Parasitol. 2012;188(3-4):203-14.
- O'Handley RM, Olson ME. Giardiasis and Cryptosporidiosis in Ruminants. Vet Clin North Am - Food Anim Pract. 2006;22(3):623-643.
- Gargala G. Drug treatment and novel drug target against Cryptosporidium. Parasite. 2008;15(3):275-281.
- Chartier C, Mallereau M-P, Naciri M. Prophylaxis using paromomycin of natural cryptosporidial infection in neonatal kids. Prev Vet Med. 1996;25(3-4):357-361.
- Fayer R, Ellis W. Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves. J Parasitol. 1993;79(5):771-774.
- Grinberg A, Lopez-Villalobos N, Markovics A, Kosak A, Galindez J, Tranquillo VM. Controlling the onset of natural cryptosporidiosis in calves with paromomycin sulphate. Vet Rec. 2002;151(20):606-608.
- Viu M, Quilez J, Sánchez-Acedo C, Del Cacho E, López-Bernad F. Field trial on the therapeutic efficacy of paromomycin on natural Cryptosporidium parvum infections in lambs. Vet Parasitol. 2000;90(3):163-170.
- Najdrowski M, Heckerroth AR, Wackwitz C, Gawłowska S, Mackenstedt U, Kliemt D, et al. Development and validation of a cell culture based assay for in vitro assessment of anticryptosporidial compounds. Parasitol Res. 2007;101(1):161-167.
- Jarvie BD, Trotz-Williams LA, McKnight DR, Leslie KE, Wallace MM, Todd CG, et al. Effect of halofuginone lactate on the occurrence of Cryptosporidium parvum and growth of neonatal dairy calves. J Dairy Sci. 2005;88(5):1801-1806.
- Giadinis ND, Papadopoulos E, Panousis N, Papazahariadou M, Lafi SQ, Karatzias H. Effect of halofuginone lactate on treatment and prevention of lamb cryptosporidiosis: An extensive field trial. J Vet Pharmacol Ther. 2007;30(6):578-582.
- Lefay D, Naciri M, Poirier P, Chermette R. Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves. Vet Rec. 2001;148(4):108-112.
- Naciri M, Mancassola R, Yvoré P, Peeters JE. The effect of halofuginone lactate on experimental Cryptosporidium parvum infections in calves. Vet Parasitol. 1993;45(3-4):199-207.
- Trotz-Williams LA, Jarvie BD, Peregrine AS, Duffield TF, Leslie KE. Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. Vet Rec. 2011;168(19):509.
- Lindsay DS, Woods KM, Upton SJ, Blagburn BL. Activity of decoquinate against Cryptosporidium parvum in cell cultures and neonatal mice. Vet Parasitol. 2000;89(4):307-311.
- Moore DA, Atwill ER, Kirk JH, Brahmabhatt D, Alonso LH, Hou L, et al. Prophylactic use of decoquinate for infections with Cryptosporidium parvum in experimentally challenged neonatal calves. J Am Vet Med Assoc. 2003;223(6):839-845.
- Lallemond M, Villeneuve A, Belda J, Dubreuil P. Field study of the efficacy of halofuginone and decoquinate in the treatment of cryptosporidiosis in veal calves. Vet Rec. 2006;159(20):672-677.
- Naguleswaran A, Alaeddine F, Guionaud C, Vonlaufen N, Sonda S, Jenoe P, et al. Neospora caninum protein disulfide isomerase is involved in tachyzoite-host cell interaction. Int J Parasitol. 2005;35(13):1459-1472.
- Schnyder M, Kohler L, Hemphill A, Deplazes P. Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against Cryptosporidium parvum in experimentally challenged neonatal calves. Vet Parasitol. 2009;160(1-2):149-154.
- Ollivett TL, Nydam D V., Bowman DD, Zambriski JA, Bellosa ML, Linden TC, et al. Effect of nitazoxanide on cryptosporidiosis in experimentally infected neonatal dairy calves. J Dairy Sci. 2009;92(4):1643-1648.
- Elitok B, Elitok ÖM, Pulat H. Efficacy of azithromycin dihydrate in treatment of cryptosporidiosis in naturally infected dairy calves. J Vet Intern Med. 2005;19(4):590-593.
- Paraud C, Pors I, Journal JP, Besnier P, Reisdorffer L, Chartier C. Control of cryptosporidiosis in neonatal goat kids: Efficacy of a product containing activated charcoal and wood vinegar liquid (Obioneck®) in field conditions. Vet Parasitol. 2011;180(3-4):354-357.
- Watarai S, Tana, Koiwa M. Feeding activated charcoal from bark containing wood vinegar liquid (Nekka-Rich) is effective as treatment for cryptosporidiosis in calves. J Dairy Sci. 2008;91(4):1458-1463.
- Hunt E, Fu Q, Armstrong MU, Rennix DK, Webster DW, Galanko JA, et al. Oral bovine serum concentrate improves cryptosporidial enteritis in calves. Pediatr Res. 2002;51(3):370-376.
- Chartier C, Paraud C. Coccidiosis due to Eimeria in sheep and goats, a review. Small Rumin Res. 2012;103(1):84-92.
- Jolley WR, Bardsley KD. Ruminant Coccidiosis. Vet Clin North Am - Food Anim Pract. 2006;22(3):613-621.

35. Mundt HC, Bangoura B, Mengel H, Keidel J, Dausgschies A. Control of clinical coccidiosis of calves due to *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* with toltrazuril under field conditions. *Parasitol Res.* 2005;97:134-142.
36. Dausgschies A, Najdrowski M. Eimeriosis in cattle: Current understanding. *J Vet Med Ser B Infect Dis Vet Public Heal.* 2005;52(10):417-427.
37. Aksoy G, Kurtdele A, Gül Y, Ağaoglu TZ, Dodurka T, Akgül Y, Kaymaz Akdoğan A, Kalınbacak A, Or E, Keleş I, Bakırel U, Erdoğan MH, Çitil M, İssi M. Geviş Getiren Hayvanların İç Hastalıkları. In: Gül Y, editör. 3. Baskı. Malatya: Medipres Matbaacılık; 2012. s:144-148.
38. Engidaw S, Anteneh M, Demis C. Coccidiosis in Small Ruminants. *African J Basic Appl Sci.* 2015;7(6):311-319.
39. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. *Veterinary Medicine A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* 10th edition, W.B. Saunders Co; 2008. p: 1483-1540.
40. Mundt HC, Dausgschies A, Uebe F, Rinke M. Efficacy of toltrazuril against artificial infections with *Eimeria bovis* in calves. *Parasitol Res.* 2003;90(3):166-167.
41. Geurden T, Vercruyse J, Claerebout E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Exp Parasitol.* 2010;124(1):98-106.
42. Ural K, Aysul N, Voyvoda H, Ulutas B, Aldemir OS, Eren H. Single dose of secnidazole treatment against naturally occurring *Giardia duodenalis* infection in Sakiz lambs. *Rev MVZ Córdoba.* 2014;19(1):4023-4032.
43. Volpato A, Fortuoso BF, Campigotto G, Glombowsky P, Bottari NB, Lopes LS, et al. Secnidazole for control of giardiasis in dairy calves. *Exp Parasitol.* 2018;189:16-18.
44. Toros G, Ural K. Single dose secnidazole treatment efficiency against naturally occurring *Giardia duodenalis* infection in calves. *Rev MVZ Córdoba.* 2018;23(2):6660-6670.
45. Edlind TD, Hang TL, Chakraborty PR. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* in vitro. *J Infect Dis.* 1990;162(6):1408-14011.
46. Meloni BP, Thompson RCA, Reynoldson JA, Seville P. Albendazole: a more effective anti-giardial agent in vitro than metronidazole or tinidazole. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990;84(3):375-379.
47. O'Handley RM, Olson ME, McAllister TA, Morck DW, Jelinski M, Royan G, et al. Efficacy of fenbendazole for treatment of giardiasis in calves. *Am J Vet Res.* 1997;58(4):384-388.
48. Xiao L, Saeed K, Herd RP. Efficacy of albendazole and fenbendazole against *Giardia* infection in cattle. *Vet Parasitol.* 1996;61(1-2):165-170.
49. O'Handley RM, Cockwill C, Jelinski M, McAllister TA, Olson ME. Effects of repeat fenbendazole treatment in dairy calves with giardiasis on cyst excretion, clinical signs and production. *Vet Parasitol.* 2000;89(3):209-218.
50. Albay MK, Sahinduran S, Adanir R, Yukari BA, Kose O. Doğal infekte giardiasisli kuzuların tedavisinde albendazol ve iki farklı paromomisin dozunun etkisinin karşılaştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2011;17(6):1021-1024.