



Official Publication of
The Afyon Kocatepe University
Faculty of Veterinary Medicine

K o c a t e p e Veterinary Journal

2021, 14(2), June



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

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

DergiPark
AKADEMİK

ADVISORY BOARDS

Publisher

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

Editor in Chief

Assoc. Prof. Dr. Zeki GÜRLER

Editors

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

Assist. Editors

Assoc. Prof. Dr. Muhammed Enes İNANÇ
Dr. Özlem GÜCÜYENER HACAN
Dr. Eyüp Eren GÜLTEPE

Section Editors

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

Foreing Language Editor

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

Statistics Editors

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

Organising Committee

Prof. Dr. Fatih FİDAN
Prof. Dr. Metin ERDOĞAN
Assoc. Prof. Dr. Mustafa KABU
Assoc. Prof. Dr. Fatih AVDATEK
Dr. Barış DENK
Research Assist. Murat KIRIKKULAK

Prof. Dr. Arif Altıntaş

Prof. Dr. Atilla Şimşek

Prof. Dr. Cevdet Uğuz

Prof. Dr. Yavuz O. Birdane

Prof. Dr. İbrahim Demirkan

Prof. Dr. İlhami Çelik

Prof. Dr. İsmail Bayram

Prof. Dr. Abdullah Kaya

Prof. Dr. Mustafa Alışarlı

Prof. Dr. Nalan Baysu Sözbilir

Prof. Dr. Recep Aslan

Prof. Dr. Seyfullah Haliloğlu

Prof. Dr. Zafer Karaer

Prof. Dr. Zehra Bozkurt

Prof. Dr. İbrahim Taşal

Prof. Dr. Şule Kaya

Prof. Dr. Korhan Altunbaş

Prof. Dr. Aysun Demirkan

Prof. Dr. Hasan Çiçek

Prof. Dr. Fatih M. Birdane

Assoc. Prof. Dr. Süleyman Aypak

Assoc. Prof. Dr. Oktay Yılmaz

Assoc. Prof. Dr. İbrahim Kılıç

Assist. Prof. Dr. M. Fatih Bozkurt

Ankara University -Turkey

Selçuk University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Ondokuz Mayıs University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Ankara University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Mehmet Akif Ersoy University-Turkey

Mehmet Akif Ersoy University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Adnan Menderes University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

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

Kocatepe Veterinary Journal;

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

Addressed:

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

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

www.kvj.aku.edu.tr

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

Only accepts online submission

The Reviewer List (in alphabetical order)

Ahmet CEYLAN	Ankara University
Ali AYDIN	İstanbul University
Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU	Aksaray University
Aydın VURAL	Dicle University
Aytül KÜRÜM	Kırıkkale University
Celal Şahin ERMUTLU	Kafkas University
Cengiz CEYLAN	Balıkesir University
Caner Çağrı CINGI	Afyon Kocatepe University
Damla ACARÖZ	Afyon Kocatepe University
Fatma Tülin ÖZBAŞER	Namık Kemal University
Gökmen Zafer PEKMEZCİ	Ondokuz Mayıs University
Halil YALÇIN	Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Harun ÇINAR	Burdur Mehmet Akif Ersoy University
İlkay DOĞAN	Gaziantep University
Mikail ARSLAN	Onyedi Eylül University
Mustafa ARICAN	Selcuk University
Mustafa ESER	Anadolu University
Nuri MAMAK	Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Özge ÖZCAN	Kırklareli University
Ruhi TÜRKMEN	Afyon Kocatepe University
Seyda ŞAHİN	Cumhuriyet University
Tuncer ÇAKMAK	Van Yüzüncü Yıl University
Tülay ÖZCAN	Uludağ University
Ulaş ACARÖZ	Afyon Kocatepe University

RESEARCH ARTICLES

- Investigation of Availability of Dried Mulberry Pomace Instead of Barley for Ruminants** (*Ruminantlar için Arpa Yerine Kurutulmuş Dut Posasının Kullanılabilirliğinin Araştırılması*) 177-186
İsmet Burak KAYA, Zehra SELÇUK
- Investigation of the Relationship Between Q-Fever Seropositivity and Trace Element Levels in Dairy Cattle** (*Sütçü Sığırlarda Q hummasının Seropozitifliği ve Eser Elementler Arasındaki İlişkinin Araştırılması*) 187-192
Fatma ATES ALKAN, Zehra Seda MAVILI, Banu DOKUZEYLUL, Çağla PARKAN YARAMIS, Serkan IKIZ, Sinem ULGEN SAKA, Mehmet Erman OR
- Effects of Two Different Immunomodulators on Calf Diarrhea in Neonatal Calves** (*Neonatal Buzağlarda İki Farklı İmmunomodülatörün Buzağ İshalleri Üzerine Etkileri*) 193-200
Gökhan SAYBER, Mustafa KABU
- Isolation of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* from Chicken Internal Organs Retailed in Afyonkarahisar by Immunomagnetic Separation Method and Determination of Antibiotic Resistance of Isolates** (*Afyonkarahisar'da Satışa Sunulan Tavuk İç Organlarından *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes*'in İmmunomagnetik Seperasyon Yöntemi ile İzolasyonu ve İzolatların Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi*) 201-209
Özgür SEPİN, Şebnem PAMUK
- Economic Losses Associated with Fertility in Dairy Farms** (*Süt Sığırı İşletmelerinde Döl Verimi ile İlişkili Ekonomik Kayıplar*) 210-216
İbrahim GÜLTEKİN, Mustafa TEKERLİ
- The Effects of TGF-β3, 17-β Estradiol and Bisphenol A on Osteoprotegerin Production in Osteoblasts** (*TGF-β3, 17-β Estradiol ve Bisphenol A'nın Osteoblastlar Üzerinde Osteoprotegerin Üretimine Etkileri*) 217-224
Tayfun DİKMEN
- Prevalence of *Toxocara vitulorum* in Calves in Afyonkarahisar, Turkey** (*Afyonkarahisar Yöresi Buzağlarında *Toxocara vitulorum* Yaygınlığının Belirlenmesi*) 225-230
Esmâ KOZAN, Fatih Mehmet BİRDANE, Mahmut Sinan EREZ, Ahmet GÖKSU
- Investigation of Heavy Metal Residues in Heat-Treated Drinking Milk Offered for Sale in the Market** (*Piyasada Satışa Sunulan Isı İşlemi Görmüş İçme Sütlerinde Ağır Metal Kalıntılarının Araştırılması*) 231-237
Zeynep Azat CIDIROĞLU, Ali AYDIN
- Alteration of Boza Microbiota in the Fermentation Process** (*Boza Mikrobiyotasının Fermantasyon Sürecindeki Değişimi*) 238-246
Murat Kavruk, Mediha Nur ZAFER YURT, Behiye Büşra TAŞBAŞI, Elif Esmâ ACAR, Ali SOYUÇOK, Osman ALTUNBAŞ, Veli Cengiz ÖZALP, Mert SUDAGIDAN
- Microbiological Profile of Top Caps of Drinks Offered for Sale in Tin Free Still (TFS) Can** (*Tin Free Still (TFS) Ambalajlar İçerisinde Satışa Sunulan İçeceklerin Üst Kapaklarının Mikrobiyolojik Profili*) 247-254
Gökhan AKARCA, İlknur GÜNEY
- A Histochemical and Immunohistochemical Study on Glandula Mandibularis Mast Cells in Angora Goat** (*Ankara Keçisinde Glandula Mandibularis Mast Hücreleri Üzerine Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Bir Çalışma*) 255-261
Tuğrul ERTUĞRUL
- Investigation of the Effect of Vitamin C and Vitamin E on Serum Protein Fractions in Rats with Experimental Fluorosis** (*Deneyisel Olarak Florozis Oluşturulan Ratlarda Vitamin C ve Vitamin E'nin Serum Protein Fraksiyonları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması*) 262-267
Semiha DEDE, Ahmet Cihat ÖNER, Veysel YÜKSEK, Sedat ÇETİN, Ayşe USTA
- Investigation of Effect of Somatic Cell Count and Seasons on Buffalo Milk Quality** (*Somatik Hücre Sayısının ve Mersimin Manda Süt Kalitesine Etkisinin Araştırılması*) 268-273
Zeki GÜRLER, Erkan KARADAŞ, Esmâ KOZAN, Hacı Ahmet ÇELİK, Fatih Mehmet BİRDANE, Recep KARA, Ulaş ACARÖZ

CASE REPORTS

- Penile Prolapse in a Pekin Duck (*Anas platyrhynchos domesticus*)** (*Bir Pekin Ördeğinde Penil Prolapsı (*Anas platyrhynchos domesticus*)*) 274-277
Uğur ERSOZ, Sıtkan OKUR, Mumin Gokhan SENOCAK, Latif Emrah YANMAZ, Ferda TURGUT, Yakup KOCAMAN
- Aelurostrongylus abstrusus* Infection and Radiographic Findings in a Kitten** (*Bir Yavru Kedide *Aelurostrongylus abstrusus* Enfeksiyonu ve Radyografik Bulgular*) 278-283
Ersay BAYDAR, Feyyaz KAYA

Investigation of Availability of Dried Mulberry Pomace Instead of Barley for Ruminants

İsmet Burak KAYA¹, Zehra SELÇUK^{2*}

¹Ondokuz Mayıs University, Institute of the Health Sciences, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, 55200, Samsun, Turkey

²Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, 55200, Samsun, Turkey

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the effect of substitution of barley with the different amounts of dried white mulberry pomace (DWMP) and dried red mulberry pomace (DRMP) on *in vitro* true digestibility (IVTD) values. The mixtures were formed as: barley (100%), DWMP (100%), DRMP (100%), barley+DWMP (75%+25%), barley+DWMP (50%+50%), barley+DWMP (25%+75%), barley+DRMP (75%+25%), barley+DRMP (50%+50%), barley+DRMP (25%+75%). There were no differences for IVTD, *in vitro* true dry matter digestibility (IVTDMD), and *in vitro* true organic matter digestibility (IVTOMD) values between barley and barley+DWMP (75%+25%). Although, IVTD, IVTDMD, and IVTOMD values of barley+DWMP (75%+25%) and barley+DWMP (50%+50%) were similar, the same digestibility values of the mixture containing barley+DWMP (50%+50%) were lower ($P<0.05$) than those of barley. While substitution of barley with DWMP increased ($R^2=0.7754$) *in vitro* true neutral detergent fiber digestibility (IVTNDFD), substitution of barley with DRMP did not change IVTNDFD. In conclusion, due to nutrient composition and digestibility of DWMP, barley may be substituted with DWMP up to 50% in diets of livestock raised for meat or milk production. Further studies are needed to determine the effects of barley substitution with DWMP on *in vivo* digestibility, rumen fermentation, fattening performance or milk production.

Key Words: Barley; *In vitro* true digestibility; Dried mulberry pomace; Ruminant

Ruminantlar için Arpa Yerine Kurutulmuş Dut Posasının Kullanılabilirliğinin Araştırılması

ÖZ

Bu çalışmada, arpanın, kurutulmuş beyaz dut posası (KBDP) ve kurutulmuş kırmızı dut posası (KKDP) ile farklı düzeylerde ikamesinin *in vitro* gerçek sindirilebilirlik (IVGS) değerleri üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Karışımlar şu şekilde oluşturuldu: arpa (%100), KBDP (%100), KKDP (%100), arpa+KBDP (%75+%25), arpa+KBDP (%50+%50), arpa+KBDP (%25+%75), arpa+KKDP (%75+%25), arpa+KKDP (%50+%50), arpa+KKDP (%25+%75). Arpa ve arpa+KBDP (%75+%25) arasında IVGS, *in vitro* gerçek kuru madde sindirilebilirlik (IVGKMS) ve *in vitro* gerçek organik madde sindirilebilirlik (IVGOMS) değerleri açısından bir farklılık yoktu. Arpa+KBDP (%75+%25) ve arpa+KBDP (%50+%50)'ya ait IVGS, IVGKMS ve IVGOMS değerleri benzer olmasına karşın, arpa+KBDP (%50+%50) içeren karışımın aynı sindirilebilirlik değerleri arpaya göre daha düşük ($P<0,05$) bulundu. Bununla beraber, arpanın %25 düzeyinde KKDP ile ikamesine ilişkin IVGS değerleri arpaninkilerden daha düşüktü ($P<0,05$). Arpanın KBDP ile ikamesi *in vitro* gerçek nötral deterjan fiber sindirilebilirlik (IVGNDFS) değerini arttırırken ($R^2=0,7754$), arpanın KKDP ile ikamesi IVGNDFS değerini etkilememiştir. Sonuç olarak, KBDP'nin besin madde bileşimi ve sindirilebilirlik değeri nedeniyle, arpa, et veya süt hayvanlarının rasyonlarında %50'ye kadar KBDP ile ikame edilebilir. Arpanın KBDP ile ikamesinin *in vivo* sindirilebilirlik, rumen fermentasyonu, besi performansı veya süt verimi üzerine etkilerini belirlemek için çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Arpa; *In vitro* gerçek sindirilebilirlik; Kurutulmuş dut posası; Ruminant

To cite this article: Kaya İ.B. Selçuk Z. Investigation of Availability of Dried Mulberry Pomace Instead of Barley for Ruminants. Kocatepe Vet J. (2021) 14(2):177-186

Submission: 21.01.2021 Accepted: 04.04.2021 Published Online: 08.04.2021

ORCID ID; İBK: 0000-0002-2383-9621 ZS: 0000-0002-6060-4514

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

INTRODUCTION

The use of agro-industrial by-products for livestock nutrition is old as the domestication of animals by humans (Bampidis and Robinson 2006). The cereals are common ingredients in human and animal nutrition. The use of agro-industrial by-products as an ingredient in livestock diets can be resulted in a decrease in requirement of cereals and, also a diminish in needs for waste management programs which are highly cost (Grasser et al. 1995). Therefore, these industrial by-products, rich in structural carbohydrates and where they are regionally available, have a potential for ruminant nutrition and they could provide some nutrients necessary for growth and development of the rumen microbial ecosystem. (Bampidis and Robinson 2006).

The pomaces, produced by the food industry as by-products, might be major alternative feed sources in the world and in Turkey (Çapçı et al. 2002). Recently, the use of these industrial by-products as animal feed has become widespread by farmers living in regions where they can be obtained. In animal nutrition, there are many studies conducted with by-products such as tomato pomace (Ebeid et al. 2015, Sargın and Denek 2017, Selçuk et al. 2019), apple, peach and apricot pomaces (Yalçınkaya et al. 2012), apple pomace (Ülger et al. 2018) and its mixture with tomato pomace (Abdollahzadeh et al. 2010), sugar beet pulp (Boguhn et al. 2010, Aldemir and Karslı 2012), grape pomace (Özdüven et al. 2005, Dinic et al. 2015) and mulberry pomace (Zhou et al. 2012, Niu et al. 2016).

Mulberry (*Morus* spp.) can develop in different climatic conditions ranging from temperate to tropical climate. The fruits of the mulberry tree are used in human consumption, its leaves are used in silkworm cultivation, medicine production and animal nutrition (Sharma and Zote 2010). Mulberry pomace, mostly consists of stem and peel parts of the mulberry and constituting approximately 8% of the weight of the fresh mulberry taken into processing, is a by-product of the production of mulberry juice (Elmacı and Altuğ 2002). In general, mulberry pomace is either utilized as a soil fertiliser or discarded in landfill sites, which causes to environmental pollution (Zhou et al. 2014).

Zhou et al. (2012) stated that water-soluble carbohydrate, protein and neutral detergent fiber (NDF) contents of mulberry pomace are 20.85, 21.86 and 49.06%, respectively. In a study (Zhou et al. 2014), corn grain and cotton seed meal were partially replaced by ensiled mulberry leaves and sun-dried mulberry fruit pomace at the level of 8 and 6.3%, respectively. The diets, prepared isocaloric and isonitrogenous and supplemented with these two mulberry products, had been resulted in similar effects on performance, blood biochemical parameters and carcass features of steers. However, experimental diets, partly substituted by ensiled mulberry leaves or sun-dried mulberry fruit pomace,

were resulted in variable levels of ruminal volatile fatty acids and lower intramuscular fat contents compared to control diet (Zhou et al. 2014).

Niu et al. (2016) investigated the effects of diets supplemented with 8% ensiled mulberry leaves or 6.3% ensiled sun-dried mulberry fruit pomace on rumen bacteria and archaeal populations in finishing steers. According to the results of the study conducted by Niu et al. (2016), the partial replacement of corn grain and cotton seed meal with ensiled mulberry leaves or sun-dried mulberry fruit pomace had no substantial effects on the rumen bacteria or archaea population.

Available local agro-industrial by-products containing structural carbohydrate might be an alternative feed ingredients in ruminant nutrition due to the rumen microbial ecosystem utilizing these by-products (Bampidis and Robinson 2006). Although, some studies (Zhou et al. 2012, Zhou et al. 2014, Niu et al. 2016) have reported that the using of mulberry leaves silages and sun-dried mulberry pomace in ruminants, the effect of partial use of dried mulberry pomace instead of cereals in ruminant nutrition on digestibility is unknown. The aim of this study was to determine the effect of substitution of barley with the different amounts of dried white mulberry pomace (DWMP) and dried red mulberry pomace (DRMP) on *in vitro* true digestibility (IVTD) values.

MATERIALS and METHODS

Feed Material

Barley, DWMP and DRMP were used as feed material in the study. The mixtures were prepared to substitute barley with DWMP and DRMP at different levels (Table 1). The prepared mixtures were ground to pass through a 1 mm sieve for nutrient analysis and Ankom Daisy[®] *in vitro* fermentation system.

Chemical Analyses

Ash, dry matter (DM), ether extract (EE) and crude protein (CP) contents of the samples were analysed according to AOAC (2006). Acid detergent fiber (ADF) and NDF analyses were performed according to Van Soest et al. (1991) using Ankom Fiber Analyzer. Metabolizable energy values of samples were calculated by TSI (1991).

Determination of *In vitro* True Digestibility

Preparation of filter bags

After F57 filter bags were rinsed in acetone for three minutes and allowed to dry, they were weighed and marked. 0.5 g of barley, DWMP, DRMP and their mixtures which contain barley+DWMP and barley+DRMP passed through a 1 mm sieve were weighed into each filter bag (8 bags for barley, DWMP, DRMP and their each mixture) for 48 hours digestion. The bags were sealed by an impulse bag sealer. A bag as a blank was used without sample.

Rumen Content

Rumen content obtained from cows freshly slaughtered at a local slaughterhouse was collected into a prewarmed thermos (39 °C under a CO₂ atmosphere) and immediately transferred to the laboratory, and then rumen content was filtered through four layers of cheese cloth. pH value of rumen fluid was measured as 6.35. Anaerobic conditions were maintained throughout the preparation stages of rumen fluid and conduct of the experiment.

In vitro digestion method

The Ankom Daisy^{II} *in vitro* fermentation system was used for determination of *in vitro* true digestibility. The Ankom Daisy^{II} *in vitro* fermentation system has an equipment designed with four rotating digestion jars. Buffer solutions for *in vitro* fermentation system were prepared and poured into each digestion jar of incubator according to described by Ankom. The procedure for *in vitro* fermentation system was conducted according to the operating instructions supplied by Ankom. The temperature of buffers was set 39 °C before 400 mL rumen fluid and prepared bags were added to each digestion jar. After each digestion jar was aerated with CO₂ immediately, incubator was activated for 48 hours. After

incubation period, the incubation medium inside of each digestion jar was discharged. The bags were gently washed under running water until they were completely clean and then they were placed in the Ankom Fiber Analyzer and NDF procedure was performed. *In vitro* true digestibility (IVTD), *in vitro* true dry matter digestibility (IVTDMD), *in vitro* true NDF digestibility (IVTNDFD) and *in vitro* true organic matter digestibility (IVTOMD) values of the samples were calculated with equations consisting the difference between the amount of incubated and the residue after NDF analysis for the different treatments.

Statistic Analysis

The data were summarized in the form of arithmetic means and standard errors. The statistical significance for each feed mixture used in the study was determined by one-way variance analysis. Tukey Posthoc test was used to determine statistical differences. Relationship between increasing levels of DWMP or DRMP in the mixtures and IVTD values was determined by regression analysis. SPSS (2012) package program was used for statistical analysis.

Table 1. The feed mixtures

Mixtures	B %	DWMP %	DRMP %
B	100	0	0
DWMP	0	100	0
DRMP	0	0	100
75%B+25%DWMP	75	25	0
50%B+50%DWMP	50	50	0
25%B+75%DWMP	25	75	0
75%B+25%DRMP	75	0	25
50%B+50%DRMP	50	0	50
25%B+75%DRMP	25	0	75

B: Barley, DWMP: Dried White Mulberry Pomace, DRMP: Dried Red Mulberry Pomace

Table 2. Nutritional value (%) and metabolizable energy value (MJ/kg) of B, DWMP, DRMP and substitution of B with DWMP and DRMP

Mixtures	DM	Ash	OM	CP	EE	CF	ADF	NDF	ME
B	90.76	2.55	88.21	13.18	1.73	4.62	7.60	25.31	11.75
DWMP	93.83	3.72	90.11	9.62	6.43	10.28	16.39	19.09	11.68
DRMP	92.61	2.93	89.68	17.12	12.18	19.10	25.83	30.80	11.12
%75B+%25DWMP	91.82	2.79	89.03	12.18	2.99	6.24	10.26	30.25	11.76
%50B+%50DWMP	92.88	3.17	89.71	11.43	3.93	7.25	11.59	21.54	11.80
%25B+%75DWMP	93.19	3.47	89.72	10.17	4.95	8.47	14.19	23.41	11.85
%75B+%25DRMP	91.37	2.53	88.84	13.14	5.42	8.10	11.93	25.77	11.79
%50B+%50DRMP	91.51	2.54	88.97	13.95	7.13	11.60	16.24	27.42	11.49
%25B+%75DRMP	92.10	2.94	89.16	15.58	9.65	15.03	21.68	28.38	11.34

B: Barley, DWMP: Dried White Mulberry Pomace, DRMP: Dried Red Mulberry Pomace, DM: Dry Matter, OM: Organic Matter, CP: Crude Protein, EE: Ether Extract, CF: Crude Fiber, ADF: Acid Detergent Fiber, NDF: Neutral Detergent Fiber

Table 3. IVTD, IVTDMD, IVTOMD and IVTNDFD values (%) of B, DWMP, DRMP and the substitution of B with DWMP and DRMP.

Mixtures	IVTD $x \pm Sx$	IVTDMD $x \pm Sx$	IVTOMD $x \pm Sx$	IVTNDFD $x \pm Sx$
B	88,90±0,42 ^a	87,77±0,46 ^a	88,73±0,46 ^a	21,07±0,46 ^c
DWMP	80,23±0,63 ^d	79,46±0,67 ^d	80,98±0,98 ^{de}	26,11±0,20 ^a
DRMP	68,52±0,62 ^f	66,01±0,67 ^f	67,48±0,68 ^g	20,80±0,35 ^c
%75B+%25DWMP	86,75±0,53 ^{ab}	85,57±0,58 ^{ab}	86,12±0,60 ^{ab}	23,60±0,23 ^b
%50B+%50DWMP	84,53±0,55 ^{bc}	83,34±0,60 ^{bc}	84,33±0,58 ^{bc}	24,17±0,19 ^b
%25B+%75DWMP	80,48±0,61 ^d	79,05±0,65 ^d	80,20±0,64 ^c	25,80±0,29 ^a
%75B+%25DRMP	83,91±0,32 ^c	82,39±0,35 ^c	83,18±0,33 ^{cd}	20,73±0,44 ^c
%50B+%50DRMP	80,31±0,42 ^d	79,03±0,46 ^d	79,92±0,46 ^e	21,95±0,45 ^c
%25B+%75DRMP	77,28±0,32 ^e	75,33±0,35 ^e	76,35±0,33 ^f	21,46±0,34 ^c

Different letters within the same columns indicate differences among groups ($P < 0.05$).

B: Barley, DWMP: Dried White Mulberry Pomace, DRMP: Dried Red Mulberry Pomace, IVTD: *In vitro* True Digestibility, IVTDMD: *In vitro* True Dry Matter Digestibility, IVTOMD: *In vitro* True Organic Matter Digestibility, IVTNDFD: *In vitro* True Neutral Detergent Fiber Digestibility

RESULTS

In the study, the nutrient compositions of barley, DWMP, DRMP and the substitution of barley with DWMP or DRMP at the different levels for ruminants were investigated by *in vitro* fermentation system. The nutrient composition and IVTD values of barley, DWMP, DRMP and their mixtures which contain barley+DWMP and barley+DRMP were presented in Table 2 and 3, respectively.

Whereas the IVTDMD value of barley was the highest ($87.77\% \pm 0.46$), the IVTDMD value of DRMP was the lowest (66.01 ± 0.67). Although the IVTD, IVTDMD and IVTOMD values of barley

substitution with DWMP at the level of 25% were similar to those of barley. The same IVTD values for the substitution of barley with DRMP at the level of 25% were lower than those of barley (Table 3).

There was a decrease in IVTDMD values of the mixtures which were combined with at the level of 50% DWMP or more than this level compared to barley (Figure 1). Substitution of barley with increasing level of DRMP in the mixtures was resulted in a decrease in the values of IVTDMD (Figure 2). While the replacement of barley with DWMP increased IVTNDFD (Figure 3, $R^2 = 0.7754$), substitution of barley with DRMP did not affect IVTNDFD (Figure 4).

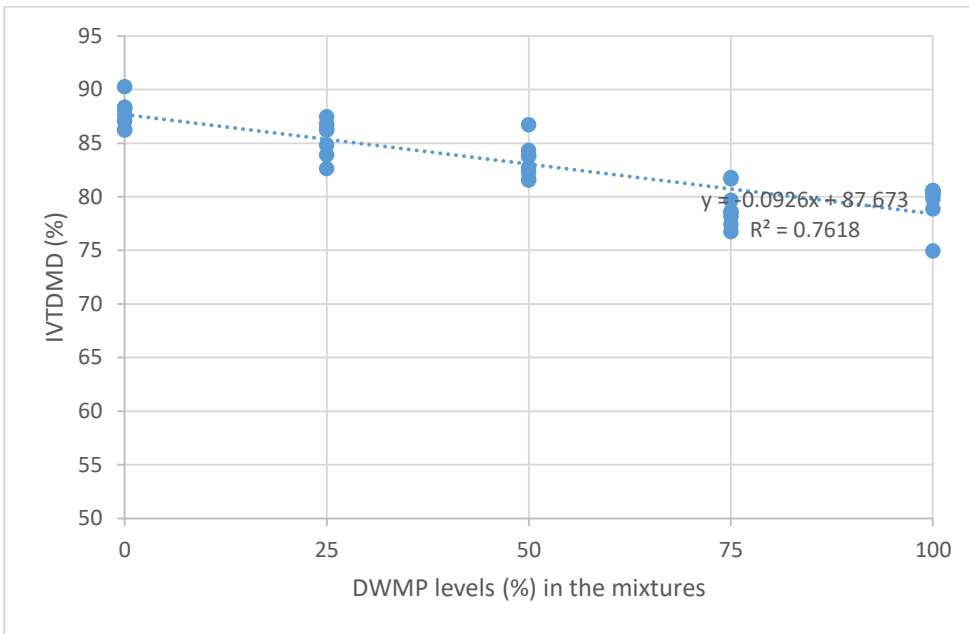


Figure 1. Regression between increasing levels of dried white mulberry pomace (DWMP) in the mixtures and *in vitro* true dry matter digestibility (IVTDMD)

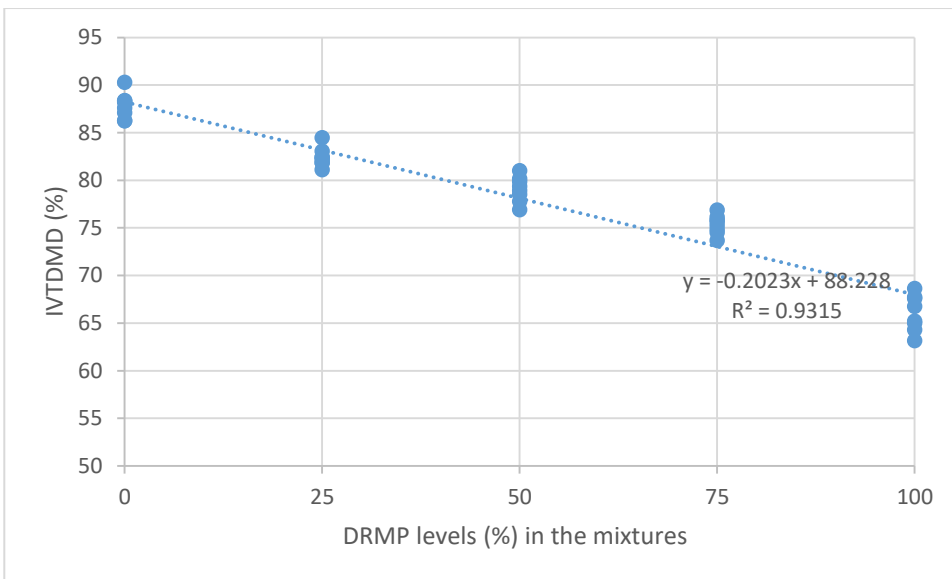


Figure 2. Regression between increasing levels of dried red mulberry pomace (DRMP) in the mixtures and *in vitro* true dry matter digestibility (IVTDMD)

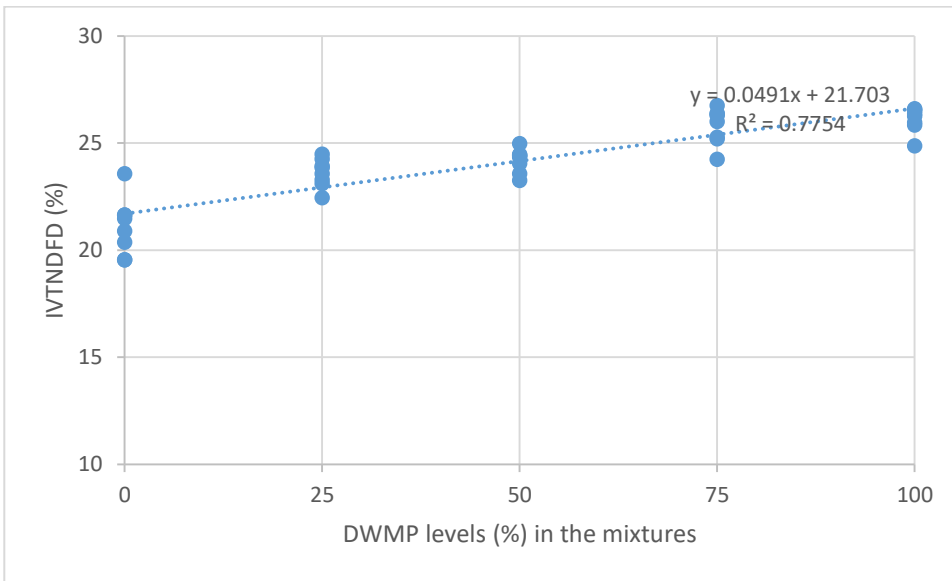


Figure 3. Regression between increasing levels of dried white mulberry pomace (DWMP) in the mixtures and *in vitro* true neutral detergent digestibility (IVTNDFD)

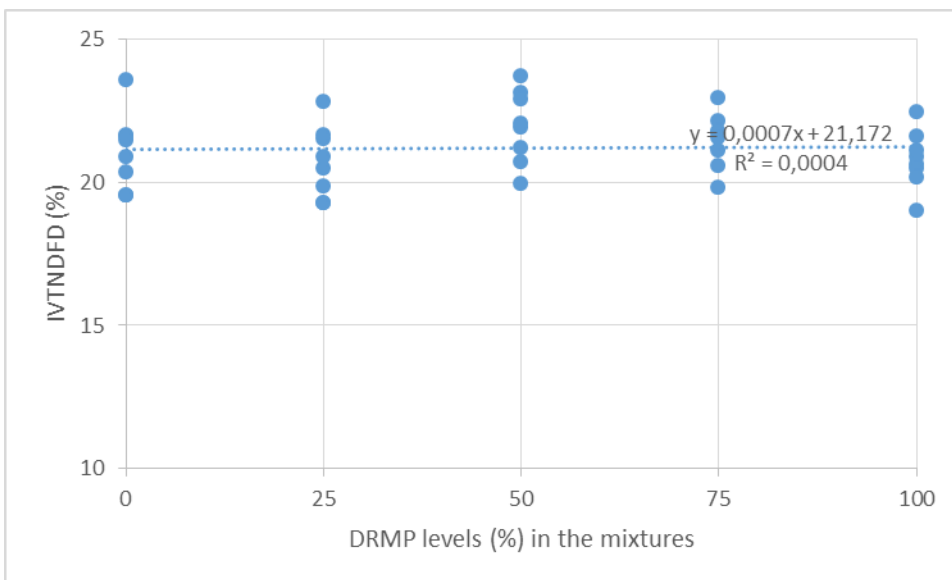


Figure 4. Regression between increasing levels of dried red mulberry pomace (DRMP) in the mixtures and *in vitro* true neutral detergent digestibility (IVTNDFD)

DISCUSSION

Ruminants can effectively utilize by-products as other feedstuffs. Since ruminants are able to utilize fiber content due to their rumen microorganisms, cereals may be partially replaced by agro-industrial by-products for reducing the competition between human and animal nutrition. Furthermore, the evaluation of these by-products can be economically worthwhile, because of an increase in price of conventional feedstuffs from day to day. Most by-products generally have low nitrogen values but more fibre contents (Mirzaei-Aghsaghali and Maheri-Sis 2008).

Despite many advantages of ruminant anatomical features and digestive physiology, the use of many agro-industrial by-products that have valuable nutritional value(s) as an alternative feed source is quite limited. Since the use of alternative feed sources may provide for a cost benefit in livestock production industry, it has been prominently attractive to determine their nutritional values for animal species among animal nutrition specialists (Klinger 2017).

In the earlier studies, the dry matter (Toprak et al. 2018, Yahaghi et al. 2012, Denli and Demirel 2016), CP and EE (Sevim et al. 2017) contents of barley were found about 90%, between 12.60-13.10% and between 1.59-1.80%, respectively. The results of the study for dry matter, CP and EE contents of barley were compatible with the previous studies. Toprak et al. (2018) and Denli and Demirel (2016) stated that the ash contents of barley were 3.60 and 5.5%, respectively. Alkan and Kandemir (2015) reported that the ADF and NDF values of varieties of barley were ranged from 6.53-9.07% and 19.77-26.61%. Although, the result of this study for ash content of barley was lower than those of Toprak et al. (2018) and Denli and Demirel (2016). The different barley kinds and varieties used in the studies and their production conditions (soil, region, precipitation, climate, fertilization etc.) may cause the differences among studies. ADF and NDF contents of barley were generally compatible with those which was reported by Alkan and Kandemir (2015) previous.

Since no study about using of different kind of dried mulberry pomace or the effect of its use for substitution of grains on *in vivo* or *in vitro* digestibility in ruminants had been found in the literature review, the results obtained from other agro-industrial by-products were used for comparing digestibility and chemical composition of dried mulberry pomace. Omer and Abdel-Magid (2015), Selcuk et al. (2013) and Keklikci and Selçuk (2018) reported that dry matter contents of tomato pomace were 92.00, 94.45 and 92.20%, respectively. In this study, dry matter contents of DWMP and DRMP were similar to those of Omer and Abdel-Magid (2015), Selcuk et al. (2013) and Keklikci and Selçuk (2018) and higher than that of dried apple pomace whose dry matter content was

reported 89.56% (Ayhan et al. 2009). In a study conducted by Zhou et al. (2012), sun-dried blackberry pomace crude protein content were found as 21.86%. Selcuk et al. (2019) stated that crude protein value of tomato pomace was 19.50%. Palangi et al. (2013) reported that crude protein contents of orange, grapefruit, lemon and tangerine pomaces were 8.68, 8.01, 7.82 and 6.81%, respectively. In the present study, although crude protein levels of both DWMP and DRMP were higher than those of orange, grapefruit, the same content was lower than that of sun-dried blackberry pomace. The crude protein content of DWMP was lower than that of tomato pomace but the same content of DRMP higher than that of tomato pomace. In this study, the ash contents of DWMP and DRMP were lower than that of tomato pomace (4.50%) stated by Selcuk et al. (2019), orange (5.1%), grapefruit (4.00%), lemon (6.9%) and tangerine (4.8%) pomaces reported by Palangi et al. (2013). Omer and Abdel-Magid (2015) and Keklikci ve Selcuk (2018) stated that ADF and NDF contents of tomato pomace were 40.93 and 49.48%, respectively. NDF value(s) of tomato pomace were reported as 65.24% (Omer and Abdel-Magid 2015) and 56.91% (Keklikci and Selcuk 2018). Zhou et al. (2012) reported that the ADF and NDF values of sun-dried black mulberry pomace were 49.06 and 37.96%, respectively. In this study, the results for ADF and NDF contents of DWMP and DRMP were lower than tomato pomace and sun-dried black mulberry pomace. The reason why the differences in the results for nutrient composition between the present study and the previous studies may caused by the different fruit and vegetable pomaces used in the previous studies and their production conditions.

Moghaddam et al. (2013), Alipour and Rouzbehan (2007) and Mirzaei-Aghsaghali et al. (2011) stated that metabolizable energy values of grape pomace investigated as an alternative feed source were 13.63, 6.69 and 7.40 MJ/kg dry matter, respectively. Keklikci and Selçuk (2018) reported that metaboliz energy value of tomato pomace was 8.16 MJ/kg dry matter. In the present study, metabolizable energy values of DWMP and DRMP were higher than that of Alipour and Rouzbehan (2007), Mirzaei-Aghsaghali et al. (2011) and Keklikci and Selçuk (2018) except for that of Moghaddam et al. (2013). This may be primarily attributed to the differences in the kind of pomace, the amount of shell and seed parts in the composition of the pomaces. However, metabolizable energy values of DWMP and DRMP were similar to that of barley.

In vitro dry matter digestibility is widely used to estimate feed digestibility since there is a strict correlation between *in vitro* dry matter digestibility and *in vivo* digestibility (Marten and Barnes 1980). Holden (1999) has stated that Daisyu incubator, simple to use

and allowing determine *in vitro* true dry matter digestibility of varied feeds, is commonly used for estimation of digestibility value. Aldemir and Karşlı (2012) showed that dry matter and organic matter degradability of barley were 80.46 and 89.85%, respectively after 48 hours of incubation in rumen using the nylon bag method. Yahaghi et al. (2012) investigated the effects of replacing barley by corn or sorghum on rumen fermentation characteristics and performance in lambs, and they informed that the dry matter degradability was 87.8% after incubation of concentrate containing 84% barley in the rumen for 48 hours. The IVTDMD value of barley in the present study was similar to that of Yahaghi et al. (2012) but higher than that of Aldemir and Karşlı (2012). However, the IVTOMD value of barley was similar to that of Aldemir and Karşlı (2012). Tahseen et al. (2014) stated that dry matter and NDF degradabilities of greenhouse wastes (tomato and cucumber) were 72 and 69.10%, respectively. Keklikci and Selçuk (2018) determined IVTDMD value of tomato pomace was 68.70%. Selçuk et al. (2019) reported that the IVTD and IVTOMD values of tomato pomace were 74.90% and 72.50%, respectively. Kılıç and Abdiwali (2016) determined that IVTD value of grape pomace was 73.80%. Palangi et al. (2013) stated that *in situ* dry matter degradability values of orange, grapefruit, lemon and tangerine pomaces were 90.20, 93.20, 83.20 and 88.50%, respectively after 48 h incubation in the rumen. The results for IVTD and IVTOMD of DWMP in the current study were higher than those of Selçuk et al. (2019) who reported for dried tomato pomace and lower than those of Palangi et al. (2013) who stated *in situ* dry matter degradability values of citrus pomace. IVTD values of DRMP were lower than the values reported for dried tomato, grape and citrus pomaces. The reason for the differences between our study and the others may be due to the kind of pomaces used in the studies.

In the current study on the substitution of barley with different levels of DWMP and DRMP, the highest and the lowest IVTDMD values belonged to barley and DRMP, respectively. IVTD, IVTDMD and IVTOMD values of the mixtures which were consisted of barley and 25% and 50% of DWMP were similar to each other. In the mixtures formed with barley and DRMP, as the level of DRMP increased, IVTD, IVTDMD and IVTOMD values decreased. Similar decreases in the values for IVTD, IVTDMD and IVTOMD were also determined in the mixtures containing 50% and more than DRMP.

Selçuk and Keklikci (2018) and Selçuk et al. (2019) reported that the IVTNDFD values of dried tomato pomace were 23.60% and 27.10%, respectively. In this study, IVTNDFD values of barley and DRMP were similar to each other but lower than that of DWMP. Although the IVTNDFD value of DWMP of the study was similar to that of Selçuk et al. (2019), the IVTNDFD value of DRMP was lower than the

results of Keklikci and Selçuk (2018) and Selçuk et al. (2019). However, the positive correlation between the replacement of barley with DWMP at increasing levels and IVTNDFD was similar to the correlation mentioned by Selçuk et al. (2019) for the mixtures containing increasing dried tomato pomace and alfalfa hay.

CONCLUSION

In conclusion, due to nutrient composition and digestibility of DWMP, barley may be substituted with DWMP up to 50% in diets of livestock raised for meat or milk production. Since replacing of barley with DRMP at the level of 25% was resulted in decreasing in IVTD values compared to barley, this substitution does not suggested. Further studies are needed to determine the effects of barley substitution with DWMP on *in vivo* digestibility, rumen fermentation, fattening performance or milk production.

Ethics Committee Information: This study is not subject to the permission of HADYEK in accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of the Animal Experiments Ethics Committees". In addition, the authors have declared that Research and Publication Ethics are observed.

Conflict of interest: The authors declare that there is no actual, potential or perceived conflict of interest for this article.

Financial support: The authors would like to extend their sincere appreciation to Ondokuz Mayıs University Research Fund (Project number: PYO.VET.1904.18.016) and the study is the summary of the first author's Master's thesis.

REFERENCES

- Abdollahzadeh F, Pirmohammadi R, Farhoomand P, Fatehi F, Pазhoh FF.** The effect of ensiled mixed tomato and apple pomace on Holstein dairy cow. *Italian J Anim Sci.* 2010; 9(2):212-216.
- Aldemir R, Karşlı MA.** Yaş şeker pancarı posası silajının arpa yerine kullanımının koyunlarda duodenuma geçen toplam protein üzerine etkisi: 1.Besin madde sindirimi ve mikrobiyal protein sentezi. *YYU Vet Fak Derg.* 2012; 23(2):89-98.
- Alipour D, Rouzbehan Y.** Effect of ensiling grape pomace and addition of polyethylene glycol on *in vitro* gas production and microbial biomass yield. *Anim Feed Sci Technol.* 2007; 137:138-149.
- Alkan RA, Kandemir N.** Tokak yerel arpa çeşidi içinden seçilen saf hatların bazı gıda, yem ve tarımsal özellikler bakımından varyasyonları. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2015; 24(2):124-139.
- AOAC.** Official Methods of Analysis, 18th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburgs, MD, 2006.
- Ayhan V, Duru AA, Özkaya S.** Possibilities of using dried apple pomace in broiler chicken diets. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2009; 15(5):669-672.
- Bampidis VA, Robinson PH.** Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Anim Feed Sci Technol.* 2006; 128:175-217.
- Boguhn J, Kluth H, Bulang M, Engelhard T, Rodehutschord M.** Effects of pressed beet pulp silage inclusion in maize-based rations on performance of high-yielding dairy cows and parameters of rumen fermentation. *Animal* 2010; 4(1):30-39.
- Çapçı T, Şayan Y, Kırkpınar F, Taluğ AM, Açıkgöz Z, Ergül M, Karayvaz KB.** Kanatlı altlığının bazı yem kaynakları ile silolanma olanakları ve yem değeri III: Domates posasının broiler altlığı ile silolanma olanakları ve yem değeri. *Ege Üniv Ziraat Fak Derg.* 2002; 39:55-62.
- Denli M, Demirel R.** Diyarbakır ili sığır besiciliği işletmelerindeki yem kullanımı ve besleme uygulamaları. *YYÜ Tar Bil Derg.* 2016; 26(4):495-499.
- Dinic B, Dordevic N, Markovic J, Sokolovic D, Blagojevic M, Terzic D, Babic S.** Impact of non-protein nitrogen substances on grape pomace silage quality. *Biotechnol Anim Husb.* 2015; 31(3):433-440.
- Ebeid HM, Gawad RMA, Mahmoud AEM.** Influence of ration containing tomato silage on performance of lactating buffaloes and milk quality. *Asian J Anim Vet Adv.* 2015; 10(1):14-24.
- Elmacı Y, Altuğ T.** Flavour evaluation of three black mulberry (*Morus nigra*) cultivars using GC/MS, chemical and sensory data. *J Sci Food Agr.* 2002; 82(6):632-635.
- Grasser LA, Fadel JG, Garnett I, DePeters EJ.** Quantity and economic importance of nine selected by-products used in California dairy rations. *J Dairy Sci.* 1995; 78:962-971.
- Holden LA.** Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. *J Dairy Sci.* 1999; 82:1791-1794.
- Keklikci A, Selçuk Z.** Domates posasının ruminantlar için sindirilebilirliğinin belirlenmesi. *Vet Hekim Der Derg.* 2018; 89(2):58-65.
- Kılıç Ü, Abdiwali MA.** Alternatif kaba yem kaynağı olarak şarapçılık endüstrisi üzüm atıklarının *in vitro* gerçek sindirilebilirlikleri ve nispi yem değerlerinin belirlenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2016; 22:895-901.
- Klinger ACK, de Silva LP, de Toledo GSP, Galarreta B, Goulart F.** Effect of sweet potato vines on performance parameters and some carcass characteristics of rabbits. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2017; 102:152-156.
- Marten GC, Barnes RF.** Prediction of energy digestibility of forages with *in vitro* rumen fermentation and fungal enzyme systems, In: Standardization of Analytical Methodology for Feeds, Ed; Pigden WJ, Balch CC, Graham M., Int Dev Res Center, Ottawa, Canada. 1980; pp.61-128.
- Mirzaei-Aghsaghali A, Maheri-Sis N.** Nutritive value of some agro-industrial by-products for ruminants - A Review. *WJZ.* 2008; 3(2):40-46.
- Mirzaei-Aghsaghali A, Maheri-Sis N, Mansouri H, Razeghi ME, Shaddeltelli A, Aghajanzade-Golshani A.** Estimation of the nutritive value of grape pomace for ruminant using gas production technique. *Afr J Biotechnol.* 2011; 10:6246-6250.
- Moghaddam M, Taghizadeh A, Nobakht A, Ahmadi A.** Determination of metabolizable energy of grape pomace and raisin vistic leaves using *in vitro* gas production technique. *Anim Prod.* 2013; 15:40-46.
- Niu Y, Meng Q, Li S, Ren L, Zhou B, Schonewille T, Zhou Z.** Effects of diets supplemented with ensiled mulberry leaves and sun-dried mulberry fruit pomace on the ruminal bacterial and archaeal community composition of finishing steers. *PLoS ONE* 2016; 11(6):e0156836.
- Omer HAA, Abdel-Magid SS.** Incorporation of dried tomato pomace in growing sheep rations. *Glob Vet.* 2015; 14(1):01-16.
- Özdüven ML, Coşkuntuna L, Koç F.** Üzüm posası silajının fermantasyon ve yem değeri özelliklerinin saptanması. *Trakya Univ J Sci.* 2005; 6:45-50.
- Palangi V, Taghizadeh A, Sadeghzadeh MK.** Determine of nutritive value of dried citrus pulp various using in situ and gas production techniques. *J Bio Env Sci.* 2013; 3(6):8-16.
- Sargın HG, Denek N.** Effect of adding different levels of dried molasses sugar beet pulp on the silage quality and *in vitro* digestibility of wet tomato pomace silage. *Harran Üniv Vet Fak Derg.* 2017; 6(1):84-89.
- Selcuk M, Selcuk Z, Kahraman Z, Ciftci G, Akal E.** Effects of dried tomato pulp used as a feed ingredient in breeder roosters' diets on blood and semen antioxidant status and some sperm parameters. *Revue Med Vet.* 2013; 164(8-9):435-442.
- Selçuk Z, Salman M, Muruz H.** Determination of *in vitro* digestion values of alfalfa hay, dried tomato pomace and their combinations. *Van Vet J.* 2019; 30(1):63-66.
- Sevim B, Ayaşan T, Ülger İ, Ergül Ş, Aykanat S, Coşkun AM.** Farklı maltık arpa çeşitlerinin besin değerlerinin *in vitro* gaz üretim tekniği kullanılarak tespiti. *Türk Tarım Gıda Bilim Teknol Derg.* 2017; 5(10):1216-1220.
- Sharma SK, Zote KK.** MULBERRY-A multi purpose tree species for varied climate. *Range Mana Agrofor.* 2010; 31:97-101.
- SPSS.** IBM SPSS statistics for Windows, version 21,0. Armonk, NY: IBM Corp, 2012.
- Tahseen O, Abdallah J, Omar JA.** In situ degradability of dry matter, crude protein, acid and neutral detergent fiber of olive cake and green house wastes of tomato and cucumber. *Revue Med Vet.* 2014; 165(3-4):93-98.
- Toprak NN, Yavaş İ, Bilgel C.** Besi sığır rasyonlarında tamamlayıcı yem olarak farklı şekillerde işlenmiş arpa ve mısır kullanımının performans, bazı biyokimyasal parametreler ile serum laktat ve bikarbonat düzeyi üzerine etkileri. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Derg.* 2018; 22(2):275-283.

- TSI (Turkish Standards Institution).** Animal feeds: Determination of metabolizable energy (chemical method). TS9610, Ankara, 1991.
- Ülger I, Kaliber M, Ayaşan T, Küçük O.** Chemical composition, organic matter digestibility and energy content of apple pomace silage and its combination with corn plant, sugar beet pulp and pumpkin pulp. *S Afr J Anim Sci.* 2018; 48(3):497-503.
- Van Soest PJ, Robertson JD, Lewis BA.** Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 1991; 74:3583-3597.
- Yahaghi M, Liang JB, Balcells J, Valizadeh R, Alimon AR, Ho YW.** Effects of replacing barley with corn or sorghum grain on rumen fermentation characteristics and performance of Iranian Baluchi lamb fed high concentrate rations. *Anim Prod Sci.* 2012; 52:263-268.
- Yalçınkaya MY, Baytok E, Yörük MA.** Değişik meyve posası silajlarının bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 2012; 9(2):95-106.
- Zhou B, Meng QX, Ren LP, Shi FH, Wei Z, Zhou ZM.** Evaluation of chemical composition, in situ degradability and *in vitro* gas production of ensiled and sun-dried mulberry pomace. *J Anim Feed Sci.* 2012; 21:188-197.
- Zhou Z, Zhou B, Ren L, Meng Q.** Effect of ensiled mulberry leaves and sun-dried mulberry fruit pomace on finishing steer growth performance, blood biochemical parameters, and carcass characteristics. *PLoS ONE* 2014; 9(1):e85406.

Investigation of the Relationship Between Q-Fever Seropositivity and Trace Element Levels in Dairy Cattle

Fatma ATES ALKAN^{1,2}, Zehra Seda MAVILI³, Banu DOKUZEYLUL⁴, Cagla PARKAN YARAMIS⁵, Serkan IKIZ³, Sinem ULGEN SAKA⁴, Mehmet Erman OR^{4*}

¹Beykent University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Istanbul, Turkey

²Istanbul University Cerrahpaşa, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Istanbul, Turkey

³Istanbul University Cerrahpaşa, Faculty of Veterinary Science, Department of Microbiology Istanbul, Turkey

⁴Istanbul University Cerrahpaşa, Faculty of Veterinary Science, Department of Internal Medicine, Istanbul, Turkey

⁵Istanbul University Cerrahpaşa, Vocational School of Veterinary Faculty, Equine and Equine training programme, Istanbul, Turkey

ABSTRACT

Query fever (Q fever) which is caused by *Coxiella burnetii* is a continuing problem as a zoonotic disease in the world. In ruminants, infections are mostly asymptomatic however, abortions and stillbirths may occur during late pregnancy. Trace elements are important for the reproductive performance of ruminants and all have roles in immune function. However, serum trace element levels of *Coxiella* seropositive infertile and healthy dairy cows have not been investigated yet. The present was aimed to evaluate the trace element status of cattle associated with *Coxiella burnetii*. For this purpose, 200 dairy cattle with and without clinical problems (infertility, metritis and abortion) were compared. Q fever infection was confirmed with ELISA. Levels of trace elements of samples were analysed utilizing inductively coupled plasma-optical emission spectrophotometer. Serum levels of trace elements of the samples were expressed as µg/mL. In total, 20 of 200 sera were diagnosed to be positive by ELISA. Nine of 20 sera were positive from asymptomatic cattle. Seven of 11 sera were positive from cattle with infertility, while 4 of 11 sera were positive from cattle with abortion. No significant differences were found between trace element levels of ELISA seropositive cattle and asymptomatic seropositive cattle. In conclusion, although statistical analysis of serum trace elements is no significant, our findings clearly show that analysis of trace element levels in cattle may be useful predictors in early treatment and prognosis. Further studies are required to clarify the connection between *Coxiella* seropositivity, trace elements and clinical symptoms in cattle.

Keywords: Cattle, ELISA, Trace Elements, Q Fever

Sütçü Sığırlarda Q hummasının Seropozitifliği ve Eser Elementler Arasındaki İlişkinin Araştırılması

ÖZ

Q humması, *Coxiella burnetii* tarafından oluşturulan ve tüm dünyada devam eden zoonoz bir hastalıktır. Ruminantlarda enfeksiyon genellikle asemptomatik seyretmekte, ancak gebeliğin geç döneminde abort ve ölü doğumlar görülebilmektedir. Eser elementler ruminantlarda üreme performansı ve immün fonksiyon üzerinde önemli rol oynar. *Coxiella* pozitif olan kısır ve sağlıklı süt ineklerinde serum eser element düzeyleri henüz araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı; sığırlarda *Coxiella burnetii* ile ilişkili serum eser element düzeylerinin değerlendirilmesidir. Bu amaçla klinik olarak hasta olan (infertilite, metritis, abort) ve olmayan süt sığırları karşılaştırıldı. Q ateşi ELISA yöntemiyle teşhis edildi. Eser element seviyelerinin ölçümü, indüktif olarak eşleşmiş plazma-optik emisyon spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirildi. Serum örneklerinden elde edilen sonuçlar µg/mL cinsinden belirtildi. Toplamda 200 örnekten 20 serum ELISA ile pozitif olarak saptandı. Asemptomatik sığırlardan elde edilen 20 serumun 9'u pozitif olarak tespit edildi. Abort yapan sığırlardan elde edilen 11 serumdan 4'ü pozitifken, infertilitesi olan sığırların 7'si pozitif olarak belirlendi. ELISA seropozitif ve asemptomatik seropozitif sığırların serum eser element düzeyleri arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Sonuç olarak; serum eser element seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamasına rağmen çalışmamızda sığırlarda erken tedavi ve prognozun belirlenmesinde eser element analizlerinin kullanışlı bir yöntem olduğu görüldü. Sığırlarda *Coxiella* seropozitifliği, eser elementler ve klinik semptomlar arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amacıyla daha fazla çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sığır, ELISA, Eser Elementler, Q Humması

To cite this article: Alkan F.A, Mavili Z.S, DokuzeYLül B, Yaramış C.P, İkiz S, Saka S.U, Or M.E. Investigation of the Relationship Between Q-Fever Seropositivity and Trace Element Levels in Dairy Cattle. Kocatepe Vet J. (2021) 14(2):187-192

Submission: 08.12.2020 Accepted: 04.04.2021 Published Online: 20.04.2021

ORCID ID; F.A.A: 0000-0001-6429-9572, Z.S.M: 0000-0002-8371-6551, B.D: 0000-0003-3086-4726, Ç.P.Y: 0000-0002-5048-9452, S.İ: 0000-0001-6502-0780, S.Ü.S: 0000-0002-2198-6396, M.E.O: 0000-0002-8764-1956

*Corresponding author e-mail: ermanor@istanbul.edu.tr

INTRODUCTION

Coxiella burnetii is an obligate intracellular parasite distributed worldwide causing acute and chronic Q fever for humans, and abortions and infertility for animals (Marrie 1990, Marrie 1995, Maurin and Raoult 1999). It was firstly defined by Edward Derrick among abattoir workers in Australia in 1935, and was named as Q (for query) fever as widely known worldwide. It represents significant public health problems, particularly where there is a close contact with farm animals and meat products (Milazzo et al. 2001). Ruminants are the main reservoirs of infection, although other animals can also be infected (Angelakis and Raoult 2010). Infection of ruminants is usually subclinical but clinical signs including abortions, stillbirths and the of weak offspring can occur (Arricau-Bouvery and Rodolais 2005). Routine laboratory diagnosis of Q fever is usually determined by serological tests as immunofluorescence, complement fixation and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and molecular test as polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR (Jones et al. 2011).

Trace elements, though required in low quantities (less than 100 mg/kg dry matter), are essential for maintaining health and strengthening the immune system. Moreover, they are involved in growth, production and reproduction. Trace elements act as cofactors of enzymes which are important to the immunity of the animal (Andrie 2008, Gressley 2009, Hesari et al. 2012). Trace elements are vital for optimal functioning of many enzymes and proteins, as they take place in many important processes for growth and production. Besides, trace elements promote immune defence mechanisms and reproductive performance (Siciliano-Jones et al. 2008, Spears and Weiss 2008). Trace elements (chromium, magnesium, cobalt, copper, iron, manganese, selenium and zinc) are important for the influence reproductive performance of ruminants and all have roles in immune function. Earlier Manspeaker et al. (1987) reported the more importance of minerals in reproduction in cattle. However, trace elements are so important for reproductive performance in livestock because their unbalance leads to serious problems in reproduction (Kumar et al. 2011, Grace and Knowles 2012). Copper (Cu) and zinc (Zn) are important for the regulation of progesterone production by luteal cells. Zn is involved in the rearrangement of ovarian follicles which are the source of progesterone. Yıldız and Akar (2001) were suggested that Cu-Zn levels of serum correlated with progesterone level of serum in cows positively. Selenium (Se) is important in normal cattle production systems as its distinctive relationship to postpartum uterine involution (Arthington 2005). Chromium (Cr) is also presumed to be essential for ruminant metabolism. However, research results are not available (Mayland and Shewmaker 2001). Furthermore, iron (Fe) plays an important role in ovarian activity (Gottsch et al. 2000, Sales et al. 2011).

In the present study, we aimed to evaluate the relationship between chromium, magnesium, cobalt, copper, iron, manganese, selenium and zinc serum levels and *Coxiella burnetii* in cattle.

MATERIAL and METHODS

Determination of Study Groups

This study was approved by The Local Ethical Committee for Animal Experiments of Istanbul University (No:2010/78). A population of 200 cattle from Istanbul and Thracia district (Edirne, Kırklareli, Tekirdağ), Turkey between July 2011 and August 2012 were randomly enrolled in the study (Fig. 1). Age, geographical origin of animals, reproductive problems and presence of ticks were recorded where available. Cattles with reproductive problems, mastitis and presence of ticks were also included in the study.

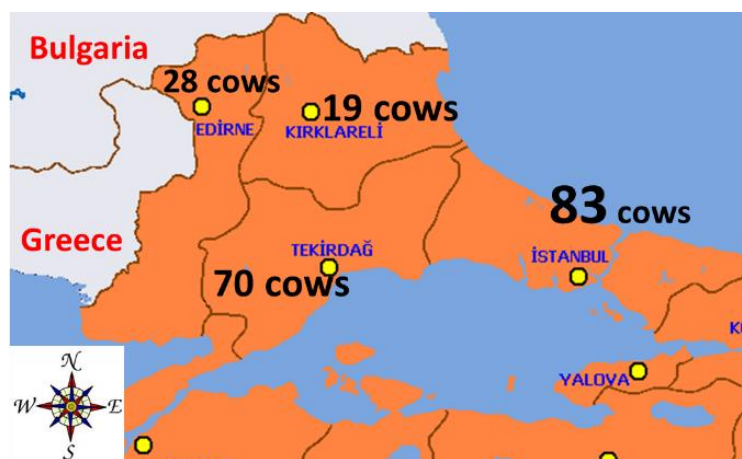


Figure 1. Samples collected regions

In total, 20 out of 200 (10%) cattle was diagnosed with Q-fever by ELISA. Nine (Group 1) of these cattle did not show any clinical symptoms of this disease, seven (Group 2) had infertility problem and the remaining four (Group 3) cattle had the history of abortus in the past. Blood samples were kept vertically in room temperature for the coagulation of the serum.

Blood samples were centrifugated at 3000 rpm for 20 min utilizing Hettich Universal centrifuge and obtained serum samples were used for serological assays and trace element analysis. After the exclusion of hemolyzed blood samples, serum samples were stored in Eppendorf tubes placed in a -80 °C deep freezer until the analysis of serological test parameters and trace elements.

Determination of Antibodies

The serum samples of animals were analysed for antibodies against *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) using Q-fever Antibody Test Kit (CHEKIT Q-fever) (product no: BGAF-B - 101) due to the protocol planned by the manufacturer (Idexx). *C. burnetii* IgG antibodies were detected in serum samples of animals via standardized ELISA.

Preparation of Samples

All the glassware used were placed in 10% v/v) HNO₃ solution overnight for the elimination of adsorbed metals. Then glassware were washed thoroughly using distilled water and dried overnight in an oven at 100 °C. After being thawed at room temperature, serum samples were diluted with distilled water in a fresh tube of 10 ml with an automatic pipette prior to analysis. All diluted serum samples were vortexed for 15 min using a shaker just before the trace element analysis. Trace element analysis of serum samples were conducted utilizing

inductively coupled plasma-optical emission spectrophotometer (ICP-OES Thermo iCAP - 6000) equipped with an auto sampler controlled by a computer (Karis et al. 2019).

Trace Element Analysis

The analysis of serum chromium (Cr), Cu, Fe, magnesium (Mg), manganese (Mn), Se, Zn and cobalt (Co) levels have been conducted utilizing ICP-OES at the Trace Element Analysis Laboratory at Biophysics Department of Cerrahpasa Medical Faculty. ICP-OES has different wavelengths for every trace element; 267.716 nm for Cr, 327.396 nm for Cu, 259.940 nm for Fe, 285.210 nm for Mg, 257.610 nm for Mn, 196.090 nm for Se, 206.200 nm for Zn and 228.616 nm for Co. The technical plasma operating rates used for ICP-OES system plasma gas flow rate of 5 L/min, argon carrier flow rate of 0.5 L/min, sample flow rate and elution flow rate of 1.51 L/min with a peristaltic pump at a speed of 100 rpm. 1.25-mm-i.d. polytetrafluoroethylene tubing system was used as transport lines. Each serum sample analysis was performed triplicate and averages of these three measurements were calculated for the final results. Results of serum samples were expressed in microgram per milliliter (ppm = µg/mL) (Karis et al. 2019).

Test standards for each trace element were prepared from stock solutions containing 1000 ppm for each analysed element obtained from Chem - Lab NV (Belgium). All reagents used were analytical grade, and distilled water was utilized as a blank solution. Stock solutions for each trace element were prepared by taking definite amounts of standards in distilled water. Freshly prepared standard solutions for each trace element before the analysis are indicated in Table 1.

Table 1. Table of used standards for trace elements

Standart name	Stated (µg/mL)
Standart 1	0.05
Standart 2	0.10
Standart 3	0.50
Standart 4	1.00

Distilled water used in the current study was doubly distilled. Clean bench was used to decrease contamination risk from ambient air and dust. All the glassware were cleaned by 10% (v/v) HNO₃ solution overnight prior to the study, washed thoroughly with distilled water and dried overnight at 100 °C in an oven. The calibration graph was obtained from blank

and standard solutions used for trace element analysis using ICP-OES (Ates Alkan et al. 2019).

Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted using the statistical analysis software package SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 21. ELISA results expressed as mean values ± SEM were compared

using non-parametric Mann-Whitney U test. Trace element levels expressed as median, mean and standard deviation (SD) were assessed by Kruskal – Wallis test following the transformation to normalized data and equalized variance if necessary. The significance level was considered as 0.05 ($p < 0.05$).

RESULTS

Antibodies against *C. burnetii* were determined 20 out of 200 serum samples tested by ELISA. In total, 20 out of 200 (10%) serum were found to be positive by ELISA. Serum Cr levels was 0.008 ± 0.006 , 0.005 ± 0.003 , 0.008 ± 0.004 $\mu\text{g/mL}$ in study groups,

respectively. No significant difference was detected in three groups of serum Cr levels. Serum Cu, Se and Zn levels were higher both Group 2 and 3. They are higher than Group 1 and no statistical significance detected. It was observed that Cu, Se and Zn levels were also higher in Group 2 and 3 than those in Group 1, whereas no significant difference was present in three groups. When the levels of serum Fe, Mg, Mn and Co were compared, there was no statistically difference between Group 1, 2 and 3 ($p > 0.05$) (Table 2).

Table 2. Trace element levels of the groups

Parameter ($\mu\text{g/mL}$)	Group 1 (n=9)			Group 2 (n=7)			Group 3 (n=4)			P Value ^a
	Median	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	Mean	SD	
Cr	0.005	0.008	0.006	0.004	0.005	0.003	0.005	0.008	0.006	0.725
Cu	0.509	0.500	0.059	0.516	0.457	0.172	0.462	0.527	0.172	0.885
Fe	1.648	1.763	0.447	1.399	1.517	0.443	1.764	1.717	0.211	0.901
Mg	14.530	14.1037	2.167	12.870	12.694	3.032	13.750	13.983	1.831	0.595
Mn	0.002	0.003	0.003	0.002	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001	0.403
Se	0.184	0.187	0.043	0.212	0.208	0.072	0.201	0.198	0.025	0.758
Zn	0.559	0.5431	0.182	0.534	0.547	0.237	0.711	0.666	0.103	0.397
Co	0.001	0.003	0.003	0.001	0.001	0.001	0.002	0.003	0.002	0.875

Cr, chromium; Cu, copper; Fe, iron; Mg, magnesium; Mn, manganese; Se, selenium; Zn, zinc; and Co, cobalt.
^aStatistical comparison of Groups 1, 2 and 3 by Kruskal-Wallis Test

DISCUSSION

Q fever is an obligate intracellular gram-negative bacteria created by *Coxiella burnetii* and seen all over the world is zoonotic infectious diseases. Factors reservoir is primarily farm animals (cattle, sheep, goats while), but other pets (cats, dogs, rabbits), birds and ticks are (Maurin and Raoult 1999, Madariaga et al. 2003). *C. burnetii* infection in goats, sheep and cattle causes abortion and reproductive system disorders (CFSPH 2017). Symptoms of Q fever in cattle; abortion, birth of dead or weak offspring, seen as metritis and infertility (Lang 1990, Maurin and Raoult 1999, Clemente et al. 2009). The animals included in our study with was reproductive problems, and non-dairy cattle. In this study, it's

aimed to evaluate the relationship between chromium, magnesium, cobalt, copper, iron, manganese, selenium and zinc serum levels and *Coxiella burnetii* in cattle. Hundred reproductive problems (metritis, miscarriage and infertility) were seen in female cattle including the ones in which these problems were never seen and 200 animal blood and milk samples were collected. *C. burnetii* was investigated and compared in terms of the presence of infection. In this study, blood serum samples taken from cattle in order to analyse serologic screening for the detection of *C. burnetii* - specific antibodies were examined by ELISA. For this reason, both capable of detecting phase I to phase II antigen specific antibodies against Q fever CHEKIT kit (IDEXX) were used. In our study, total of 12

cows about 4 (33%) were identified as seropositive. Abortion (Group 3) is common in animal seropositivity rate was higher than the other groups (Group 1 and 2). The difference was revealed to be compatible with data statistically significant ($p < 0.05$). Trace elements are available in essential quantities in all metabolic processes. These physio-biochemical processes are related to growth, reproduction and production. Therefore, trace elements affect both the health and production performance of animals (Andrie 2008, Grace and Knowles 2012, Ates Alkan et al. 2019).

CONCLUSION

In conclusion, although there was no statistical significance among serum trace elements, our findings postulate that analysis of serum trace element levels in cattle (with / without clinical symptoms) might be useful predictors in early treatment and prognosis. Further studies are required to clarify the point of connection between seropositive cattle and asymptomatic seropositive cattle by means of their clinical symptoms and trace element levels. The results of the current study reveals that serum levels of trace elements might be precious markers for early diagnosis for Q-fever. Our plans for future include multi-centric investigations also conducted with other trace elements, toxic elements and minerals within a longer follow-up period.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University. Project number: BEK-2016-21354.

Ethical Statement

This study was found in accordance with the principles of the Ethics Committee of Istanbul University with the decision of "Animal Experiments Local Ethics Committee, dated 06.05.2010 and Decision No: 78.

Conflict of Interest:

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Andrie S.** Is there a role for organic trace element supplements in transition cow health? *Vet J.* 2008; 176: 77-83.
- Angelakis E, Raoult D.** Q fever. *Vet Microbiol.* 2010; 140(3): 297-309.
- Arricau-Bouvery N, Rodolais A.** Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res.* 2005; 36(3): 327-49.
- Arthington JD.** Trace mineral nutrition and the immune response in cattle. Proc "64th Annual Minnesota Nutrition Conference", Minneapolis, MN. 2005; 106.
- Ates Alkan F, Karis D, Cakmak G, Ercan AM.** Analysis of the relationship between hemorheologic parameters, aluminum, manganese, and selenium in smokers. *Biol Trace Elem Res.* 2019; 187(1): 22-31.
- CFSPH (2017)** Q fever. Available at http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/q_fever.pdf: (Accessed Feb 4, 2020).
- Clemente L, Barahona MJ, Andrade MF, Botelho A.** Diagnosis by PCR of *Coxiella burnetii* in aborted fetuses of domestic ruminants in Portugal. *Vet Record.* 2009; 164(12): 373-374.
- Gottsch ML, Murdoch WJ, Van Kirk EA.** Tumour necrosis factor alpha upregulates matrix mineral metalloproteinase-2 activity in preovulatory ovine follicles metamorphic and endocrine implications. *Reprod Fertil Develop.* 2000; 12: 75-80.
- Grace ND, Knowles SO.** Trace element supplementation of livestock in New Zealand: Meeting the challenges of free-range grazing systems. *Vet Med Int.* 2012; 12: 1-8.
- Gressley TF.** Zinc, copper, manganese, and selenium in dairy cattle rations. Proc "7th Annual Mid-Atlantic Nutrition Conference" 2009; pp. 56-71.
- Hesari BA, Mohri M, Seifi HA.** Effect of copper edetate injection in dry pregnant cows on hematology, blood metabolites, weight gain and health of calves. *Trop Ani Health Prod.* 2012; 44(5): 1041-1047.
- Jones RM, Hertwig S, Pitman J, Vipond R, Aspan A, Bölske G, McCaughey C, McKenna JP, Rotterdam BJ, Bruin A, Ruuls R, Buijs R, Jan Roest H, Sawyer J.** Inter laboratory comparison of real-time polymerase chain reaction methods to detect *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever. *J Vet Diagn Invest.* 2011; 23(1): 108-111.
- Karis D, Tarhan D, Boyacioglu K, Koksall C, Ercan AM.** The comparison of zinc, copper and iron levels in serum, aorta and left internal mammary artery tissues in coronary by-pass graft surgery patients. *J Trace Elem Med Biol.* 2019; 51: 86-90.
- Kumar S, Pandey AK, Ahmed W, Razzaque WAA, Dwivedi DK.** Importance of micro minerals in reproductive performance of livestock. *Vet World* 2011; 4(5): 230-233.
- Lang GH.** Coxiellosis (Q fever) in animals. In: Q fever. I. The disease Marrie TJ, Ed, Boca Raton, Fla, CRC Press, Inc. 1. 1990; pp. 23-48.
- Madariaga MG, Rezai K, Trenholme GM, Weinstein RA.** Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3(11): 709-721.
- Manspecker JE, Robl MG, Edwards GH, Douglas LW.** Chelated minerals: Their role in bovine fertility. *Vet Med.* 1987; 82: 951-956.
- Marrie TJ.** Epidemiology of Q fever. In: Marrie TJ (Ed), Q fever, vol 1. The disease. CRC Press, Boca Raton (FL). 1990. pp. 49-70.

- Marrie TJ.** *Coxiella burnetii* (Q fever) pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1995; 21: 253-264.
- Maurin M, Raoult D.** Q Fever. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12: 518-553.
- Mayland HF, Shewmaker GE.** Animal health problems caused by silicon and other mineral imbalances. *J Range Manag.* 2001; 54(4): 441-446.
- Milazzo A, Hall R, Storm PA, Harris RJ, Winslow W, Marmion BP.** Sexually transmitted Q fever. *Clin Infect Dis.* 2001; 33(3): 399-402.
- Sales JNS, Pereira RVV, Bicalho RC, Baruselli PS.** Effect of injectable copper, selenium, zinc and manganese on the pregnancy rate of crossbred heifers (*Bos indicus* × *Bos taurus*) synchronized for timed embryo transfer. *Livest Sci.* 2011; 142: 59-62.
- Siciliano-Jones JL, Socha MT, Tomlinson DJ, DeFrain JM.** Effect of trace mineral source on lactation performance, claw integrity, and fertility of dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2008; 9: 1985-1995.
- Spears JW, Weiss WP.** Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet J.* 2008; 176: 70-76.
- Yıldız H, Akar Y.** Relationships between serum progesterone and some mineral levels during the oestrous cycles in cows. *Firat Univ Vet J Health Sci.* 2001; 15: 77-84.

Effects of Two Different Immunomodulators on Calf Diarrhea in Neonatal Calves

Gökhan SAYBER¹, Mustafa KABU^{1*}

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

ABSTRACT

In the study, 18 new calves were used. The calves were divided into 3 groups in each group after the first controls. One of the groups was defined as control group (Group 1) and the other two groups as study groups (Group 2 and Group 3). Two different commercial immunomodulatory preparations were given to Group 2 and Group 3 while physiological saline was given for the placebo to the Control Group. Blood samples were collected at days 0, 3, 7, and 15 for immunoglobulin G (Ig) measurement and at days 0, 7, and 15 for hematological measurements. In hematological examination; Leukocyte (WBC), Lymphocyte (LENF), Monocyte (MON), Granulocyte (GRAN), Lymphocyte percentage (LENF%), Monocyte percentage (MON%), Granulocyte percentage (GRAN%), Red Blood Cells (RBC), Hemoglobin (HGB) Hematocrit (HCT), Mean Cell Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Cell Hemoglobin Concentration (MCHC), Red Cell Distribution Width (RDW), Thrombocyte (PLT), Mean Platelet Volume (MPV), Thrombocyte Distribution Range (PDW) was measured. Immunoglobulin G levels were measured in the sera obtained from the blood samples. As a result of the study, IgG level was determined high on the 3rd day in Group 3. In addition, IgG levels decreased in the fastest way on control group especially on the 3rd day. We think that the newborn calves have an effect on the immunoglobulin G levels in the first fifteen days after birth.

Keywords: Diarrhea, Calf, İmmunomodulator.

Neonatal Buzağlarda İki Farklı İmmunomodülatörün Buzağı İshalleri Üzerine Etkileri

ÖZ

Sunulan çalışmada yeni doğmuş 18 adet buzağı kullanıldı. Buzağlar ilk kontrolleri yapıldıktan sonra her grupta 6 hayvan olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Gruplardan biri kontrol grubu (Grup 1) olarak, diğer iki grup ise çalışma grupları (Grup 2 ve Grup 3) olarak belirlendi. Kontrol grubuna plasebo amaçlı fizyolojik tuzlu su verilirken, Grup 2 ve Grup 3'e iki farklı ticari immunomodülatör preparat verildi. Vena jugularisten immünglobulin G (Ig) ölçümü için 0, 3, 7 ve 15. günler, hematolojik ölçümler için 0, 7 ve 15. günler kan örnekleri alındı. Hematolojik muayenede; Lökosit (WBC), Lenfosit (LENF), Monosit (MON), Granülosit (GRAN), Lenfosit yüzdesi (LENF%), Monosit yüzdesi (MON%), Granülosit yüzdesi (GRAN%), Alyuvar (RBC), Hemoglobin (HGB), Hematokrit (HCT), Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV), Ortalama Hemoglobin (MCH), Bir Eritrositteki Ortalama Hemoglobin Hacmi (MCHC), Eritrosit Dağılım Genişliği (RDW), Trombosit (PLT), Ortalama Trombosit Hacmi (MPV), Trombosit Dağılım Aralığı (PDW) ölçüldü. Alınan kanlardan elde edilen serumlarda ise immunoglobulin G seviyeleri ölçüldü. Yapılan çalışma sonucunda IgG seviyesi 3. gün en yüksek Grup 3' te tespit edildi. Ayrıca IgG seviyesi en hızlı kontrol grubunda, 3. günde düştü. Yeni doğan buzağlara 0. gün uygulanan immunomodülatörlerin yeni doğan buzağların, doğumdan sonraki ilk on beş gündeki immunoglobulin G seviyeleri üzerine etkisi olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: İshal, Buzağı, İmmunomodülatör.

To cite this article: Sayber G, Kabu M. Effects of Two Different Immunomodulators on Calf Diarrhea in Neonatal Calves. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1): 193-200.

Submission: 26.01.2021 Accepted: 07.04.2021 Published Online: 30.04.2021

ORCID ID; GS: 0000-0003-4776-545X, MK: 0000-0003-0554-7278

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

GİRİŞ

Neonatal dönem, doğumu takip eden 28 günü tanımlamak için kullanılır ve buzağılarda meydana gelen hastalık ve ölümlerin en yoğun yaşandığı dönemdir. Bu dönemde buzağılarda meydana gelen hastalıklar Dünya’da ve Türkiye’de önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu ekonomik kayıplar yeni doğan buzağı ölümlerinin yanı sıra uygulanan tedavi maliyetleri, verim kaybı, potansiyel damızlık hayvan hacminde azalmadır (Erdoğan ve ark., 2009). Buzağılarda ishale neden olan sebeplerin hızla belirlenmesi ve uygun tedavilerin seçilmesinin, bu dönemde gerçekleşen kayıpları hafifleteceği bildirilmektedir (Kalınbacak, 2003).

Maternal immunoglobulinlerin anneden buzağıya geçişi “Pasif transfer” olarak tanımlanır. Bu durum neonatal buzağuların çevresel patojenlerden korunması için elzemdir (Weaver ve ark., 2000). Maternal immunoglobulin kalitesi ve ilk besleme saati pasif immunitiyi etkileyen en önemli faktörlerdir (Abel ve Quigley, 1993). Doğumdan sonraki ilk 4 saat içerisinde immunoglobulinler en yüksek emilim düzeyine ulaşır ve zamanla bu emilim azalır (Matte ve ark., 1982). Neonatal dönemdeki buzağuların ilk 16 saatte aldıkları kolostrumun %10’undan, 20 saatte %23’ünden ve 24 saatte %50’ünden faydalanmadığı gözlenmiş, İmmunoglobulin G (IgG), İmmunoglobulin M (IgM) ve İmmunoglobulin A (IgA) alımı için bağırsak porlarının kapanma süresi doğumdan sonraki 26. saat olup, bu saatten sonra verilen kolostrum, bağırsak porlarının kapanması nedeniyle faydalı olmayacağı bildirilmiştir (Stott ve Fellah, 1983).

Buzağuların immun sistemi doğumdan sonraki yaklaşık 10. günde kendi immunoglobulinlerini üretmeye başlar ve 2 aylık yaşa geldikleri zaman normal plazma immunoglobulin seviyesine ulaşırlar (Rick, 2005). Gebelik süresince anneden fetusa geçen maddelerin cinsi ve miktarı plasentanın tipi ve yapısı ile doğrudan ilişkilidir. Ruminantlar Sindesmokorial plaseenta yapısına sahiptirler ve gebelik sırasında anneden fetusa immunoglobulin aktarımı yoktur. Bu sebeple buzağular agamaglobulinemik veya hipogamaglobulinemik olarak doğar. Kolostrum ve daha az olarak da sütle doğumdan sonra gerekli immunoglobulinleri alırlar. (Arda, 1994). Bu çalışmada immunomodülatörlerin neonatal dönemdeki buzağuların sağlığı ve immünolojik ve hematolojik parametrelerde meydana meydana getirdiği değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışma ırksal, çevresel ve bireysel farkların çalışma verileri üzerine etkisinin en aza indirilmesi, uygulama ve numune alma işlemlerinin kolay olması amacıyla, tek bir hayvancılık işletmesinde yapıldı. Bu amaçla Afyonkarahisar ili merkez ilçesine bağlı Saadet Köyünde konumlanmış bir damızlık süt işletmesinde

doğan 18 neonatal dönemdeki simental buzağı kullanıldı. Çalışmada kullanılacak buzağular seçilirken anaların aynı dönemde Rotavirus, Koronavirüs ve Escherichia coli suşları içeren inaktif aşular ile aşılanmış olmasına dikkat edildi. Çalışma grupları belirlenirken, buzağuların ilk laktasyon buzağı olmaması, analarının yaşları, buzağuların sağlıklı olması (doğumların normal ve kolay olması, yeterli ve eşit miktarda kolostrum almış olmaları) ve ikiz doğum olmamaları, sürüde uygulanan diğer koruyucu aşuların aynı dönemlerde uygulanması kriterleri göz önünde tutuldu.

Araştırmaya Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu tarafından onay (49533702/10) verildi.

Chigerwe ve ark. (2009) serum IgG düzeyinin istenilen düzeyde olması için verilmesi gereken kolostrum miktarının, doğumu takip eden ilk 4 saat içerisinde 3 L veya 3 L’den fazla olması, 12. saatte ise 1 L olması gerektiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızın materyalini oluşturan neonatal buzağılarda yeterli pasif immunitenin oluşması için uygulamalar bu doğrultuda yapılmıştır.

Buzağular her grupta (n=6) eşit buzağı bulunacak şekilde ayrıldı. Bütün buzağular doğdukları andan itibaren gruplarına göre işaretlendirilmiş ayrı buzağı kulübelere alınarak Kontrol (Grup 1), Çalışma grupları (Grup 2 ve 3) oluşturuldu. Buzağulara ilk kolostrum verilmeden önce Grup 2’ye İmmunoglobulin Y (IgY) içeren oral pasta (Ig lock-Gold, DAN), Grup 3’e de farklı bir ticari markanın IgY içeren oral pasta ürünü (Novostrum, Nova) ve kontrol grubundaki buzağulara ise plasebo maksatlı fizyolojik tuzlu su oral yol ile uygulandı.

Tüm gruplardaki buzağulardan 0. gün kan örneği alındı ve bu örnekler çalışma öncesi değerler olarak tespit edildi. Çalışmada kullanılan buzağılarda pasif transfer yetmezliği bulunup bulunmadığını tespit etmek amacıyla doğumdan sonraki 3. günler kan alındı. Ayrıca çalışmanın immunitiy üzerindeki uzun etkisini değerlendirmek için doğumdan sonraki 7. ve 15. günler kan alındı.

Çalışmada kullanılan buzağulardan serum ve plazma elde etmek için Vena Jugularisen kan alındı. İmmunoglobulin G titrelerinin ölçülmesi için antikoagülan içermeyen vakumlu kan alma tüplerine 8 ml.; WBC, LNF, MON, GRAN, LNF%, MON%, GRAN%, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW, PLT, MPV, PDW düzeylerinin belirlenmesi amacıyla antikoagülanlı (K2 EDTA) kan alma tüplerine 8 ml. kan alındı. Koagülanlı tüplere alınan kan örnekleri bekletilmeden hematolojik değerlerin ölçülmesi için laboratuvara gönderildi. Antikoagülan içermeyen tüplere alınan kanlar oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 5000 devir/dakikada 5 dakika santrifüj edildikten sonra serumları alınarak analizlerin yapılacağı güne kadar -20 °C muhafaza edilmiştir. Tüm buzağulardan 3, 7 ve 15. günler alınan gaita örnekleri hızlı ishal test kitleri incelendi.

BULGULAR

Çalışmada kullanılan buzağular doğumlarından itibaren mekonyum retensiyonu, ishal, pnömoni v.b. hastalıklar yönünden takip edildi. Hastalık belirtisi gösteren hayvanlar kayıt altına alınarak klinik incelemeleri yapıldı. Buzağuların pasif immunitésinin ve humoral bağışıklığın değerlendirilmesi için ticari IgG ELISA kiti (Cloud Clone (USCN) Bovine IgG) kullanıldı. Buzağularda tam kanda WBC, LNF, MON, GRAN, LNF%, MON%, GRAN%, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW, PLT, MPV, PDW ölçümleri cell counter ile yapıldı. Buzağulardan alınan gaita örnekleri buzağular için özel hızlı ishal test kiti (BoviD-5 AG Test Kiti) ile değerlendirildi.

İstatiksel analizler için SPSS paket programı (One Way Anova, Tukey HSD, Tamhane's T2, zamana bağlı analizler için repeated measures anova, Greenhouse-Geisser) kullanıldı. Kontrol (Grup 1) ve çalışma (Grup 2 ve Grup 3) gruplarındaki hayvanlardan elde edilen IgG konsantrasyonlarının ve hematolojik değerlerin ortalama değerleri hesaplandı. Bu çalışmada belirtilen tüm değerler "ortalama değer ± standart hata" olarak gösterildi.

Klinik Muayene Bulguları

Kontrol (Grup 1) ve çalışma (Grup2 ve Grup3) gruplarındaki buzağular 3,7 ve 15. günlerde ishal, pnömoni, omfalit ve diğer neonatal hastalıklar için muayene edildi. Buzağuların günlük olarak vücut ısıları ölçüldü ve iştahları kontrol edildi. Kontrol (Grup 1) ve çalışma (Grup2 ve Grup3) gruplarındaki buzağularda çalışma süresince iştah azalması, halsizlik, ishal ya da hastalıktan şüphe ettirecek herhangi bir belirti gözlemlenmedi. Çalışmada kullanılan hayvanlarda ölüm gözlemlenmedi.

İmmunolojik Bulgular

Çalışmada Kontrol (Grup 1) ve çalışma (Grup2 ve Grup3) gruplarındaki IgG konsantrasyonları ve gruplar arası değişimler Tablo 1'de belirtilmiştir. 3. günde Grup 3 ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 3. günde Grup 2'nin IgG konsantrasyonu grup ortalaması, kontrol grubuna göre daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. ($p>0,05$) Grupların zamana göre değişimi anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Kontrol grubu içerisinde 0. gün ile 3. gün IgG değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak 0, 7 ve 15.günlerdeki yapılan ölçümlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0,05$).

Tablo 1. Kontrol Grubu, Grup 2 ve Grup 3'ün İmmunoglobulin G Değerleri ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

	1.gün	3.gün	7.gün	15.gün	
Kontrol Grubu	6,1943±0,36 ^a	2,6293±0,44 ^{bX}	4,6885±0,34	4,5030±0,17	$p<0,05$
Grup 2	7,5001±1,93 ^a	3,6591±0,3 ^b	3,4983±0,37	4,2678±0,09	$p<0,05$
Grup 3	6,4226±1,79 ^a	4,4111±0,86 ^{bY}	4,1335±0,21	4,4465±0,18	$p<0,05$
	$p>0,05$	$p<0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$	

*Takip edilen günlerdeki (grup içi) farklar küçük harf (a,b,c,d) örneklem günündeki fark (gruplar arası) büyük harf (X,Y,Z) ile gösterilmiştir.

Hematolojik Bulgular

Sunulan çalışmada tüm değerler Tablo 2 ve Tablo 3' de verilmiştir. WBC değerleri Kontrol grubunda 0. günden 15. güne kadar artış göstermiştir. Grup 2'de 0. günden 15. güne kadar azalma göstermiştir. Grup 3'ün WBC değerlerinde bir değişiklik tespit edilemedi. En düşük WBC değerleri Kontrol grubunda ($7,01\pm0,17$ 109/L) 0.gün, Grup 2 'de ($6,88\pm1,11$ 109/L) 15.gün ve Grup 3'te ($13,51\pm2,55$ 109/L) 7.gün tespit edilmiştir. WBC değerlerin zaman içerisinde değişiminde istatistiksel bir fark tespit edilemedi ($p>0,05$). Grupların zamanla değişimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p>0,05$) (Tablo 2).

GRAN değerleri Kontrol Grubunda 0. günden 7. güne kadar azalmış, 7. günden 15. güne kadar artmıştır. Grup 2 ve Grup 3'te 0. günden 15. güne kadar azalma göstermiş olup, en düşük GRAN değerleri Kontrol Grubunda ($3,28\pm0,38$ 109/L) 7. gün, Grup 2'de ($2,38\pm0,50$ 109/L) ve Grup 3'te ($5\pm1,36$ 109/L) 15. gün tespit edildi. GRAN değerlerinin zamanla değişimi istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Grupların zamanla değişimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup, Grup 3 Kontrol grubundan farklıdır ($p<0,05$) (Tablo 2).

Tablo 2. Kontrol Grubu, Grup 2 ve Grup 3'ün Hematolojik Değerleri

		0.gün	7.gün	15.gün	P
WBC (10 ⁹ /l)	Kontrol	7,01±0,17a	9,08±0,59	12,91±1,19a	P>0,05
	Grup 2	10,2±2,96	9,31±1,75	6,88±1,11b	P>0,05
	Grup 3	14,33±1,81b	13,51±2,55	14,41±1,63b	P>0,05
	P	P<0,05	P>0,05	P<0,05	
LENF (10 ⁹ /l)	Kontrol	2,18±0,11	5,18±0,36 ^a	7,78±0,94 ^a	P<0,05
	Grup 2	2,63±0,35	2,66±0,24 ^b	3,85±0,51 ^b	P<0,05
	Grup 3	3,4±0,51	5,56±0,99 ^a	8,15±1,16 ^a	P<0,05
	P	P>0,05	P<0,05	P<0,05	
MON (10 ⁹ /l)	Kontrol	0,48±0,06	0,7±0,08	1,06±0,09 ^a	P>0,05
	Grup 2	0,76±0,15	0,81±0,18	0,58±0,07 ^b	P>0,05
	Grup 3	0,96±0,17	1,28±0,28	1,26±0,18 ^a	P>0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P<0,05	
GRAN (10 ⁹ /l)	Kontrol	4,4±0,12 ^a	3,28±0,38	3,9±0,21	P<0,05
	Grup 2	6,76±0,53 ^b	5,83±1,59	2,38±0,50 ^a	P<0,05
	Grup 3	9,96±1,34 ^b	6,66±1,50	5±136 ^b	P<0,05
	P	P<0,05	P>0,05	P<0,05	
LENF % (%)	Kontrol	30,6±1,37 ^a	57,08±3,09 ^a	59,3±1,59	P<0,05
	Grup 2	23,9±1,52 ^b	33,73±6,32 ^b	57,31±1,63	P<0,05
	Grup 3	23,58±2,09	42,78±5,68	55,88±3,16	P<0,05
	P	P<0,05	P<0,05	P>0,05	
MON % (%)	Kontrol	7,31±0,28	7,71±0,34	9,38±0,88	P<0,05
	Grup 2	7,43±0,76	8,9±0,28	9,08±0,77	P<0,05
	Grup 3	6,9±0,90	9,33±0,53	8,96±0,71	P<0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P>0,05	
GRAN % (%)	Kontrol	62,11±1,35	35,2±2,84	29,06±1,61	P>0,05
	Grup 2	68,26±2,20	124,15±64,63	33,86±2,52	P>0,05
	Grup 3	69,51±2,95	47,88±5,23	35,15±2,81	P>0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P>0,05	
RBC (10 ¹² /l)	Kontrol	7,39±0,33	6,69±0,39	6,99±0,36	P>0,05
	Grup 2	7,18±0,35	7,25±0,70	8,24±0,32	P>0,05
	Grup 3	8,2±0,53	7,36±0,67	7,54±0,73	P>0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P>0,05	
HGB (g/dL)	Kontrol	11,41±0,64	9,21±0,69	9±0,61	P<0,05
	Grup 2	10,53±0,39	10,08±1,01	11,2±0,77	P<0,05
	Grup 3	12,01±1,33	10,18±1,03	9,08±1,19	P<0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P>0,05	

*Takip edilen günlerdeki (grup içi) farklar küçük harf (a,b,c,d) örneklem günündeki fark (gruplar arası) Büyük harf (X,Y,Z) ile gösterilmiştir.

Çalışmamızda MCH değerleri tüm gruplarda 0. günden 15. güne kadar azalma göstermiştir. En düşük MCH değerleri Kontrol Grubunda (12,68±0,24 pg), Grup 2'de (13,45±0,40 pg), Grup 3'te (11,76±0,52 pg) tespit edildi. MCH değerlerinin zamanla değişimi istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). Grupların zamanla değişimleri arasında istatistiksel olarak

anlamlı bir fark olup, Grup 3 ve Kontrol grubundan farklıdır (p<0,05).

Çalışmamızda diğer hematolojik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi (p>0,05) (Tablo 3).

Çalışmada kullanılan buzağılardan 3, 7 ve 15. günlerde alınan gaita örneklerinden yapılan hızlı test kitlerinden hepsi hastalık yönünden negatif sonuç vermiştir.

Tablo 3. Kontrol Grubu, Grup 2 ve Grup 3'ün Hematolojik Değerleri

	Kontrol	34,1±1,99	28,21±2,15	27,43±1,97	P>0,05
HCT % (%)	Grup 2	31,23±1,11	31,11±4,17	31,51±1,75	P>0,05
	Grup 3	35,38±3,63	30,08±3,73	29,68±4,05	P>0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P>0,05	
	Kontrol	45,88±0,63	41,81±0,83	38,95±0,87	P<0,05
MCV (fl)	Grup 2	43,06±1,02	42,13±1,73	38,21±0,68	P<0,05
	Grup 3	42,88±1,74	40,43±1,43	33,7±6,07	P<0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P>0,05	
	Kontrol	30,66±6,86	13,7±0,34	12,68±0,24	P<0,05
MCH (pg)	Grup 2	14,51±0,37	13,9±0,16	13,45±0,40	P<0,05
	Grup 3	14,46±0,70	13,71±0,32	11,76±0,52	P<0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P>0,05	
	Kontrol	33,5±0,13	28,48±4,28	33,48±0,66 ^a	P>0,05
MCHC (g/dL)	Grup 2	33,51±0,17	33,31±1,14	35,21±0,43 ^a	P>0,05
	Grup 3	33,81±0,46	34,3±1,42	30,66±0,27 ^b	P>0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P<0,05	
	Kontrol	21,51±0,23 ^a	13,86±2,12	15,4±0,10	P<0,05
RDW % (%)	Grup 2	16,8±0,09 ^b	17,03±0,32	16,36±1,01	P<0,05
	Grup 3	19,7±1,25	16,15±0,42	15,15±0,13	P<0,05
	P	P<0,05	P>0,05	P>0,05	
	Kontrol	365,68±11,82	1163±70,69	919,83±111,21	P<0,05
PLT (10 ⁹ /L)	Grup 2	441,66±36,09	1316,83±80,69	410,33±149,98 ^a	P<0,05
	Grup 3	345±58,57	1159,33±153,52	1121±166,73 ^b	P<0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P<0,05	
	Kontrol	6,1±0,08	5,5±0,10	5,08±0,16	P<0,05
MPV (fl)	Grup 2	5,6±0,17	5,23±0,14	4,91±0,07	P<0,05
	Grup 3	6,01±0,37	5,18±0,29	5,38±0,11	P<0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P>0,05	
	Kontrol	16,88±0,11	16,21±0,06	15,58±0,09	P<0,05
PDW	Grup 2	16,5±0,15	16,2±0,14	16,46±0,34	P<0,05
	Grup 3	16,76±0,18	16,35±0,14	15,55±0,07	P<0,05
	P	P>0,05	P>0,05	P>0,05	

*Takip edilen günlerdeki (grup içi) farklar küçük harf (a,b,c,d) örneklem günündeki fark (gruplar arası) Büyük harf (X,Y,Z) ile gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Ruminantlar Sindesmokorial plasenta yapısına sahiptirler ve gebelik sırasında anneden fetusa immunoglobulin aktarımı yoktur. Bu sebeple buzağular agamaglobulinemik veya hipogamaglobulinemik olarak doğar. Kolostrum ve daha az olarak da sütle doğumdan sonra gerekli immunoglobulinleri alırlar (Arda, 1994). Çalışmamızdaki tüm buzağılardan, doğumdan 0. (doğum günü) gün alınan kan serum IgG düzeyleri, takip eden üçüncü güne kadar düşmekte, üçüncü günden sonra ise yükselmektedir. Doğumu takiben ilk 16 hafta süresince buzağılarda ölüm oranlarının belirlendiği bir araştırmada, 3479 buzağının %5'i bu süre içerisinde ölmüş ve ölen buzağuların %3,2'sinde yetersiz pasif transfer gözlenmiştir (Tyler ve ark., 1999). Yapılan saha araştırmalarında pasif transfer yetmezliğinin sürü genelinde %10 oranlarında gözlemlenen bir sorun olduğunu göstermektedir.

Yönetimin kötü olduğu işletmelerde bu oran %40'lara kadar çıkabilmektedir. Kolostrum ile yeterli seviyelerde immunoglobulin alan buzağular ile kıyaslandığında, pasif transfer yetmezliği görülen buzağuların ölüm oranı 10 kata kadar artmaktadır. Enfeksiyöz nedenlerde ölen buzağuların %90'ında pasif transfer yetmezliği olduğu bildirilmiştir (Abel Francisco ve Quigley, 1993). Çalışmamızda kullanılan kontrol ve çalışma gruplarındaki buzağuların takip edilen süreç içerisinde hastalanmalarının iyi bakım şartları ve işletmede süregelen koruyucu hekimlik hizmetleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Buzağuların immun sistemi doğumdan sonraki yaklaşık 10. günde kendi immunoglobulinlerini üretmeye başlar ve 2 aylık yaşa geldikleri zaman normal plazma immunoglobulin seviyesine ulaşırlar (Rick, 2005). Waldner ve Rosengren (2009) serum IgG konsantrasyonlarındaki düşüklüğün ve yetersiz kolostrum alımının buzağı sağlığı ve yaşama şansı üzerine negatif etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Aynı

çalışmada bağırsaklarda bulunan enterositlerde immuoglobulinlerin sadece doğumdan sonraki ilk 36 saatte emildiğini; bu durumun da serum immuoglobulin konsantrasyonunu doğumdan sonraki 36. saat dolaylarında pike ulaştırdığını bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki buzağılarda serum IgG seviyelerinin, grup gözetmeksizin doğumdan sonraki üçüncü güne kadar düşmesi kolostrum kalitesi ile ilgili, üçüncü günden sonra IgG seviyelerinin yükselmesinin sebebi ise buzağuların immun sistemlerinin aktive olmaya başlaması olabileceğini düşünmekteyiz.

Serum IgG seviyeleri düşük olan buzağılarda ölüm riskinin dört kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Osame ve ark., 1991; White, 1993). Bir çalışmada (Selim ve ark., 1995) serum IgG konsantrasyonları düşük olan neonatal buzağılarda ölüm oranı %11,7 iken, yüksek olanlarda %1,7 bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda ishal teşhis edilmiş buzağuların total immuoglobulin, IgG ve IgM seviyeleri ile kontrol grubundaki hayvanlar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunduğunu, hasta hayvanların bir kısmının immuoglobulin seviyelerinin kontrol grubu ile aynı olduğunu bildirmişlerdir (Başoğlu ve ark., 1999; İstanbulluoğlu, 1978; Osame ve ark., 1991; Selim ve ark., 1995; White, 1993). Başoğlu ve ark. (1999) buzağılarda serum immuoglobulin seviyelerinin belirlenmesinin önemli olduğunu, ancak serum immuoglobulin seviyeleri normal olan hayvanların da hastalanabileceğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızda kontrol ve çalışma gruplarının IgG seviyeleri 3. güne kadar düşüş göstermektedir. En sert düşüş kontrol grubunda gözlemlenmekle birlikte; 15 günlük klinik takip sonucu 3. gün değerleri haricinde diğer değerler önceki çalışmalar ile paralel seyretmektedir.

Gruplardan periyodik olarak alınan gaita örnekleri hızlı test kiti ile incelendiğinde testlerin hepsi hastalık yönünden negatif sonuç verdiği gözlemlendi. Bu durumun koruyucu hekimlik ve sürü yönetimi ile de ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Tam kan sayımı uygulayıcı hekimlerin bir tedavi protokolü belirlemek ve prognoz hakkında fikir yürütebilmek için klinik muayeneden sonra en önemli yardımcısıdır (Jones ve Alison, 2007). Bir parametre ya da hematolojik profilin değerlendirilebilmesi için benzer gruplardan sağlıklı hayvanların daha önce ölçülmüş referans değerlerine ihtiyaç vardır. Bu referans değerler belirlenirken genotipik değişiklikler, yaş, cinsiyet, sürü yönetimi göz önüne alınmalıdır (Friedrichs ve ark., 2012).

Geçmiş araştırmalar göz önüne alındığında buzağılarda oluşturulan hematolojik profiller çoğunlukla etçil özellikleri güçlü ırklara mensup buzağular için oluşturulmuştur (Raleigh ve Wallace, 1962; Adams ve ark., 1992; Egli ve Blum, 1998). Süt ırkları için yapılmış çalışmalar Holştayn ırkı buzağularla sınırlı kalmaktadır. Tennant ve ark. (1974) yaptıkları çalışmada 61 Jersey ve 110 Holştayn- Friesian buzağıda doğumdan sonraki altı ayın hematolojik

verileri sunulmuştur. Mohri ve ark. (2007) 32 İran Holştayn'ı buzağıda doğumdan sonraki 12 haftada, haftalık olarak yaşa bağlı hematolojik değişimleri incelemişlerdir.

İshalli buzağılarda, enterite bağlı olarak WBC değerinde artış gözlemlendiği bildirilmektedir (Şahal ve ark., 1994; Öcal ve ark., 2006). Buzağılarda doğumdan sonraki ilk üç ayda yapılan bir çalışmada WBC değerlerinin yetişkin referans aralıklarında olduğunu ve hayvandan hayvana değişen bireysel farklılıklar olabileceği belirtilmektedir (Mohri ve ark., 2007). Çalışmamızda sunulan kontrol grubu ve grup 2'ye ait WBC değerleri, paylaşılan referans aralıklar içerisinde olup; grup 3'e ait WBC değerleri referans değerlerin üzerindedir (Tablo 2). Doğum sonrası WBC'nin, yetişkin referans değerlerinin üzerine çıktığı, zamanla referans değer sınırları içine düşeceği rapor edilmiştir. (Zanker ve ark., 2001). Grup 3 içerisinde bulunan hayvanların klinik olarak hastalık belirtisi göstermemeleri ve 0. günden itibaren 15. güne kadar yüksek WBC değerlerine sahip olmaları nedeniyle bu yüksekliğin anlamlı olmadığı düşünüldü. LENF değerlerindeki anlamlı farklılığın da grupların WBC değerleri arasındaki belirgin farklılıktan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Andersen (2003) deneysel olarak hafif dozlarda endotoksemi meydana getirilen hayvanlarda geçici bir lökopeni gözlemlendiğini, MON ve GRAN değerlerinin yükseldiğini; ilerleyen dönemde ise lökositosis şekillendiğini ve bu durumun kemik iliğinden köken alan olgunlaşmış lökositlerin kan dolaşımına salınımıyla ilgili olabileceğini ve bu durumun da MON ve GRAN değerlerini yükselteceğini bildirmişlerdir. Coşkun ve Şen (2012) buzağılarda deneysel olarak endotoksemi meydana getirilmesinden sonra 8 saat içerisinde lökopeni şekillendiğini, 18. saatten sonra ise lökositosis şekillendiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda sunulan MON ve GRAN değerleri referans aralıklar içerisinde ölçülmüştür (Tablo 2).

Panousis ve ark. (2018) yürüttükleri çalışmada ishalli buzağuların, sağlıklı buzağular ile karşılaştırıldığında RBC, HGB ve HCT değerleri yüksek bulduklarını belirtmiştir. Bir başka çalışmada; Kalınbacak (2003) ishal sonucu dehidrasyon teşhisi konulmuş 12 buzağıda, hasta hayvanların tedavi sonrası 4. saatte, RBC, HCT, HGB ve WBC değerlerinin düştüğünü bildirmiştir. Buzağılarda ishal sebebiyle hücre dışı sıvı hacminin azalması sonucu hematokrit düzeyi ve plazma protein düzeyinde artış bildirilmektedir (Coles, 1986; Knowles ve ark., 2000; Zanker ve ark., 2001). Çalışmamızda sunulan RBC, HGB, RDW ve HCT değerleri literatür bilgilerle benzerdir (Tablo 2 ve Tablo 3).

Panousis ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada buzağuların yetişkinlere göre MCV değerleri %13,5; MCHC değerleri %5,2; MON değerleri %56,9 daha düşük bulduklarını bildirmişlerdir. Ramin ve ark. (2014) şiddetli anemi olgularında ortalama HGB, RBC, LENF ve MCV değerlerinin azaldığını, MCHC değerlerinin arttığını bildirmişlerdir. Bangoura ve

Dauguschies (2007) koksidiyoz enfeksiyonlarında MCV değerlerinin yükseldiğini bildirmiştir. Koçkaya ve Özşensoy (2016) enteritiste MCV değerlerinin yükselmesinin sebebinin bağırsaklardan kaybedilen kan ve elektrolitler olabileceğini bildirmiştir. Turgut (2000), enfeksiyöz durumlarda trombosit yıkımına bağlı olarak PLT değerlerinin düştüğünü bildirmişlerdir. Koçkaya ve Özşensoy (2016) koksidiyoz ile enfekte hayvanlarda HGB, HCT ve PLT değerlerinin bağırsaklardaki peteşiyel kanamalardan dolayı düştüğünü bildirmişlerdir. Çalışmamızda sunulan MCV, MCHC değerleri referans değerler aralığındadır (Tablo 3). PDW trombositlerin boyut ve hacminin nicel değerlendirmesidir ve reaktif trombositozis ile esansiyel trombositeminin ayırımında kısıtlı fayda sağlar (Threatte, 1993). MPW trombosit fonksiyon ve aktivasyonunu gösteren en önemli parametredir. MPW değerlerinin yükselmesi rejeneratif trombositopeniyi işaret eder (Abd Allah, 2013). PLT değerleri birçok çalışmada (Bangoura ve Dauguschies, 2007; Koçkaya ve Özşensoy, 2016; Panousis ve ark., 2018; Ramin ve ark., 2014; Turgut, 2000) verilen aralıkların üzerinde olup, Knowles (2000) tarafından paylaşılan referans aralık ile örtüşmektedir. Hematolojik parametrelerin değerlendirilmesinde yetişkin sığırlar için verilen referans aralıklar ve buzağılara spesifik yapılan çalışmalarda ölçülen değerler dikkate alındığında; neonatal dönemdeki buzağuların hematolojik parametreleri stabil değerler olmayıp, dalgalanmalar göstermektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz hematolojik veriler de bununla örtüşmektedir (Tablo 2 ve Tablo 3).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan çalışmamızın sonuçları göz önüne alındığı zaman; immun sistemi desteklemek amacıyla oral yol ile tek doz verilen iki imunomodülatörün, yenidoğan buzağuların serum IgG seviyeleri üzerine etkileri olduğu tespit edildi. Grupların 3. güne kadar IgG seviyeleri düşmekle beraber, bu düşüş kontrol grubuna nazaran çalışma gruplarında daha hafiftir. Geçmiş araştırmaların ağırlıklı olarak Holstein ırkı buzağularda yapıldığı göz önüne alındığı zaman simental ırkı buzağularda yapılan bu çalışmada; grupların zaman içerisindeki değişimleri ve gruplar arasında meydana gelen anlamlı farklılıkların daha detaylı incelenmesi ve bu farklılıkların neonatal buzağular üzerine olan etkilerinin açığa çıkarılması için bu konuda daha fazla sayıda çalışma yapılması faydalı olacaktır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Etik Kurul Bilgileri: AKU HADYEK 10 sayılı 14.02.2018 tarih ile izin almıştır. Ayrıca yazarlar Araştırma ve Yayın Etiğine uyulduğunu beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 18.SAĞ.BİL:21 proje numarası ile desteklenmiştir.

Açıklama: Bu çalışma Gökhan SAYBER'in aynı isimli Yüksek lisans tezinden özetlenmiştir (2019-13)

KAYNAKLAR

- Abd Allah MR.** Studying the correlations among hematological and serum biochemical constituents in cattle theileriosis. J Parasit Dis. 2013; 39(2):134-9.
- Abel Francisco SF, Quigley JD.** III. Serum immunoglobulin concentrations after feeding maternal colostrum or maternal colostrum plus colostrum supplement to dairy calves. Am J Vet Res. 1993; 54(7):1051-1054.
- Adams R, Garry FB, Aldridge BM, Holland MD, Odde KG.** Hematologic values in newborn beef calves. Am J Vet Res. 1992; 53:944-950.
- Andersen HP.** Bovine Endotoxemia Some Aspects of Relevance to Production Diseases A Review. Acta vet Scand Suppl. 2003; 98:141-155.
- Arda M.** Meme dokusunun ve sekresyonlarının immünolojik fonksiyonları; Neonatal Bağışıklık. In: İmmunoloji, Eds, Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., Düzgür, M., Diker, K.S., Ankara. 1994; 107-118.
- Bangoura B, Dauguschies A.** Parasitological and clinical parameters of experimental Eimeria zuernii infection in calves and influence on weight gain and haemogram. Parasitol Res. 2007; 100(6):1331-40.
- Başoğlu A, Çamkerten I, Servinç M.** Serum immunoglobulin concentrations in diarrhetic calves and their measurement by single radial immunodiffusion. Israel J Vet Med. 1999; 54(1):9-10.
- Chigerwe M, Tyler JW, Summers MK, Middleton JE, Schultz LG, Nagy DW.** Evaluations of factors affecting serum IgG concentration in bottle-fed calves. J Am Vet Assoc. 2009; 234(6):785-789.
- Coles EH.** Kidney Function, In Veterinary Clinical Pathology, 4th Ed, WB Saunders Company, Philadelphia. 1986; p. 171- 200.
- Coşkun, A., Şen, I.** Acute phase response and clinical changes in calves with lipopolysaccharide induced endotoxemia. Eurasian Journal of Veterinary Sciences, 2012; 28:21-26.
- Egli CP, Blum JW.** Clinical, haematological, metabolic and endocrine traits during the first three months of life of suckling simmentaler calves held in a cow-calf operation. Transbound Emerg Dis, 1998; 45:99-118.
- Erdoğan HM, Ünver A, Cital M, Güneş V, Arslan MÖ, Tuzcu M, Gökçe HG.** Dairy farming in Kars district, Turkey: III. Neonatal calf health. Turk J Vet Anim Sci. 2009; 33(3):185-192.

- Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, Blanco-Chavez J.** ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol.* 2012; 41:441–453.
- İstanbuluoğlu E.** Septicaemia neonatorumlu buzağılardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının biyokimyasal, serolojik, enterotoksijenik, antibiyotiklere duyarlılık, bulaşıcı tip plasmid (R-faktör) taşıma özellikleri ile enfekte ve normal buzağılardan elde edilen serum örneklerinin immünoglobulin miktarları (IgG, IgA) üzerinde incelemeler. Doçentlik Tezi, Ankara, 1978.
- Jain NC.** Schalm's Veterinary Hematology. 4th edn. Philadelphia, 1986.
- Jones ML, Alison RW.** Evaluation of the ruminant complete blood cell count. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2007; 23:377–402.
- Kalınbacak A.** İshalli Buzağuların Sıvı Sağaltımında Hipertonik Salin-Dextran ve Oral Elektrolit Solüsyonunun Kullanımı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2003; 50:113- 118.
- Knowles TG, Edwards JE, Bazeley KJ.** Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *Veterinary Record.* 2000; 147:593-598.
- Koçkaya M, Özşensoy Y.** Determination Of Some Blood Parameters And Macro Elements In Coccidiosis Affected Akkaraman Kangal Lambs. *Journal of Asian Scientific Research.* 2016; 6(9):138-142.
- Matte JJ, Girard CL, Seoane JR.** Absorption of colostral immunoglobulin G in the newborn dairy calf. *J Dairy Sci.* 1982; 65:1765-1772.
- Mohri M, Sharifi K, Eidi S.** Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: age related changes and comparison with blood composition in adults. *Res Vet Sci.* 2007; 83:30–39.
- Osame S, Ichijo S, Ohta C, Watanabe T, Benkele W, Goto H.** Efficacy of colostral immunoglobulins for therapeutic and preventive treatments of calf diarrhea. *J Vet Med Sci.* 1991; 53(1):87-91.
- Öcal N, Duru SY, Yağcı BB, Gazyağcı S.** İshalli buzağılarsa asit-baz dengesi bozukluklarının saha şartlarında tanı ve sağaltımı. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* 2006; 12(2):175-183.
- Panousis N, Siachos N, Kitkas G, Kalaitzakis E, Kritsepi-Konstantinou M, Valergakis GE.** Hematology reference intervals for neonatal Holstein calves. *Res Vet Sci.* 2018; 118:1-10.
- Radostits OM, Blood DC, Gay CC.** *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses.* London, Bailliere Tindall, 1994.
- Raleigh RJ, Wallace JD.** The influence of iron and copper on hematologic values and on body weight of range calves. *Am J Vet Res.* 1962; 23:296–299.
- Ramin AG, Asri-Rezaei S, Paya K, Eftekhari Z, Jelodary M, Akbari H, Ramin S.** Evaluation of Anemia in Calves up to 4 Months of Age in Holstein Dairy Herds. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg.* 2014; 40(1):1-6.
- Rick M. Colostrum.** The Key to Calf Survival, www.merricks.com, 2005.
- Selim SA, Smith BP, Cullar JS.** Serum Immunoglobulins in Calves: Their Effects and Two Easy Reliable Means of Measurement. *Vet Med.* 1995; 4:387- 404.
- Şahal M, Ünsüren H, Kurtdede A, İmren HY, Kalınbacak A, Borkü MK, Özlem MB.** Yeni Doğan İshalli Buzağuların Klinik Bulguları ve Asit-Baz Dengesi Dikkate Alınarak Sodyum Bikarbonat ve Elektrolitik Sıvılarla Sağaltımı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 1994; 41(3-4):509- 525.
- Tennant B, Harrold D, Reina-Guerra M, Kendrick JW, Laben RC.** Hematology of the neonatal calf: erythrocyte and leukocyte values of normal calves. *Cornell Vet.* 1974; 64:516–532.
- Threatte GA.** Usefulness of the mean platelet volume. *Clin Lab Med.* 1993; 13:937.
- Turgut K.** Veteriner klinik laboratuvar teşhis. Ankara: Genişletilmiş 2. Baskı, Bahçivanlar Basım Sanayi AŞ, 2000.
- Tyler JW, Parish SM, Besser TE.** Detection of low serum immunoglobulin concentrations in clinically ill calves. *J Vet Intern Med.* 1999; 13(1):40-43.
- Waldner CL, Rosengren LB.** Factors associated with serum immunoglobulin levels in beef calves from Alberta and Saskatchewan and association between passive transfer and health outcomes. *Can Vet J.* 2009; 50:275–281.
- Weaver DM, Tyler FW, Vanmetre DC, Hostetler DE, Barrington GM.** Passive Transfer of Colostral Immunoglobulins in Calves. *J Vet Intern Med.* 2000; 14:569-577.
- White DG.** Colostral supplementation in ruminants. The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian. 1993; 15:335-342.
- Zanker IA, Hammon HM, Blum JW.** Delayed feeding of first colostrums: are there prolonged effects on haematological, metabolic and endocrine parameters and on growth performance in calves? *J Anim Physiol and Anim Nut.* 2001; 53-66.

Isolation of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* from Chicken Internal Organs Retailed in Afyonkarahisar by Immunomagnetic Separation Method and Determination of Antibiotic Resistance of Isolates

Özgür SEPİN¹, Şebnem PAMUK^{2*}

¹Sepin Veterinary Clinic, Road of Ankara, Afyonkarahisar, Turkey

²Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Afyonkarahisar, Turkey

ABSTRACT

This study consists of 100 hearts and gizzards offered for retailed in Afyonkarahisar between August 2013 and February 2015. It was aimed to determine *L. monocytogenes* and *Salmonella* species by immunomagnetic separation technique in a total of 300 chicken internal organs and to determine the antibiotic susceptibility profiles of the isolates. 13% (39/300) *Salmonella* spp. 2.6% *L. monocytogenes* were detected in internal organ samples. The 39 *Salmonella* spp. 9 of the isolates were isolated from the heart (23.2%), 1 from the gizzard (2.5%), 29 (74.3%) from the liver. According to the internal organ type of *L. monocytogenes* isolate numbers are; 2 (25%) from the heart, 5 (62.5%) from the stone, and 1 (12.5%) from the liver. *Salmonella* spp. 100% of its isolates are tetracycline, chlortetracycline, and oxytetracycline, 64.1% to penicillin, 48.7% to ampicillin, 46.1% to florphenicol, 43.5% to amoxicillin resistance was found to be 26% to streptomycin, 15.3% to enrofloxacin and 7.6% to trimethoprim/sulfadiazine, whereas resistance to gentamicin was observed. 62.5% of isolates to tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline and trimethoprim / sulfadiazine, 50% to amoxicillin, florphenicol, 37.5% to enrofloxacin, 25% to ampicillin and penicillin 12.5% were found to be resistant to streptomycin. Gentamicin resistance was not detected in any of the *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* isolates.

Keywords: Antibiotic resistance, IMS, Internal organ, *Salmonella* spp, *L. monocytogenes*

Afyonkarahisar'da Satışa Sunulan Tavuk İç Organlarından *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes*'in İmmunomagnetik Seperasyon Yöntemi ile İzolasyonu ve İzolatların Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi

ÖZ

Bu çalışmada, Ağustos 2013-Şubat 2015 tarihleri arasında Afyonkarahisar'da tüketime sunulan 100'er adet yürek, taşlık ve ciğerden oluşan toplam 300 tavuk iç organ örneğinde, *L. monocytogenes* ve *Salmonella* türlerinin immunomagnetik seperasyon tekniği ile saptanması, izolatların antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İç organ örneklerinden %13 *Salmonella* spp. ve %2,6 *L. monocytogenes* saptandı. Elde edilen 39 *Salmonella* spp. izolatının 9'u yürekten (%23,2), 1'i taşlıktan (%2,5), 29'u (%74,3) karaciğerden izole edildi. *L. monocytogenes*'in iç organ çeşidine göre izolat sayıları sırasıyla; yürekten 2 (%25), taşlıktan 5 (%62,5) ve karaciğerden 1 (%12,5) adet olarak belirlendi. *Salmonella* spp. izolatlarının %100'ünün tetrasiklin, klortetrasiklin ve oksitetrasiklin'e, %64,1'inin penisilin'e, %48,7'si ampisilin'e, %46,1'inin florfenikol'e, %43,5'inin amoksisilin'e, %26'sının streptomisin'e, %15,3'ünün enrofloksasin'e, %7,6'sının trimetoprim/sülfadiazin'e dirençli olduğu saptanırken, gentamisin dirençliliği gözlemlendi. Elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının %62,5'inin tetrasiklin, klortetrasiklin, oksitetrasiklin ve trimetoprim/sülfadiazin'e, %50'sinin amoksisilin'e, florfenikol'e, %37,5'inin enrofloksasin'e, %25'inin ampisilin ve penisilin'e, %12,5'inin streptomisin'e dirençli olduğu belirlendi. *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* izolatlarının hiçbirinde gentamisin direnci saptanmadı. *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* izolatlarının en az bir ve daha fazla antibiyotige çoklu dirençli oldukları belirlendi.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik direnci, IMS, İç organ, *Salmonella* spp, *L.monocytogenes*

To cite this article: Sepin Ö. Pamuk Ş. Isolation of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* from Chicken Internal Organs Retailed in Afyonkarahisar by Immunomagnetic Separation Method and Determination of Antibiotic Resistance of Isolates. Kocatepe Vet J. (2021) 14(2):201-209

Submission: 12.12.2020 Accepted: 20.04.2021 Published Online: 03.05.2021

ORCID ID; ÖS: 0000-0002-8840-6579 ŞP: 0000-0001-7227-3364

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

GİRİŞ

Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlar içerisinde hayvansal gıda kaynaklı olguların önemli bir yere sahip olduğu yapılan epidemiyolojik çalışmalar ile ortaya konmuştur (Tonbak ve ark. 2017, Okorie-Kanu ve ark. 2020). İnsanlarda *Salmonella* enfeksiyonlarına genellikle kantin, yurt, yemekhane, hastane, restoran gibi toplu yemek tüketilen yerlerde rastlanmakta ve enfektif predominant serotipler arasında *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium bulunmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, salmonellosis vakalarına primer kontaminasyon ve soğuk zincirin kırılması ile birlikte gıdaların tedarik, işleme, paketlenme, nakil ve muhafaza aşamalarında meydana gelen çapraz kontaminasyonların neden olduğunu bildirmektedir (Diane ve ark. 2010, Abd-Elghany ve ark. 2015). Kanatlı eti karkas ya da parça et olarak tüketilebildiği gibi; kanatlıların karaciğer, yürek ve dalak gibi yenilebilir iç organlarının da geleneksel olarak yaygın bir şekilde tüketildiği bildirilmektedir (Arroyo ve Arroyo 1995a, Molla ve Mesfin 2003, Molla ve ark. 2003a, Çolak ve Hampikyan 2005, Abdellah ve ark. 2008, Abdellah ve ark. 2009, Ulloa ve ark. 2010). Gelişmekte olan ülkelerde, kanatlı iç organları, özellikle taşlık, közlenerek ve soslanarak satılan ünlü sokak yemeklerindedir. Hazır olarak tüketime sunulan bu tür gıdalar, mikrobiyolojik kaliteleri düşük olmasına rağmen, oldukça büyük bir tüketim miktarına sahiptir (Karou ve ark. 2013b). Örneğin Malezya'da *L. monocytogenes*'in tavuk iç organlarındaki biyogüvenlik düzeyi büyük bir kaygı konusudur. Malezya toplumunda iç organların en sık tüketim şekli, pirincin yanında servis edilen sokak yemekleridir. FAO'nun (Food and Agriculture Organization) istatistik verilerine göre gelişmekte olan ülkelerde 1980 yılında kişi başı iç organ tüketimi 5 gr iken, 2009 yılında neredeyse iki katına çıkarak 9 gr'a ulaşmıştır (FAO 2013). İç organlar mineral ve vitamin içeriği bakımından zengin kabul edilseler de, mikroorganizma yüklerinin fazlalığı ve birçok patojeni bünyesinde bulundurma riski olduğundan halk sağlığı açısından önem arz etmektedir (Seong ve ark. 2015). Değişik hayvan türlerinin satışa sunulan iç organlarının oldukça yüksek düzeyde *Salmonella* spp. ile kontamine olduğu ve işkembe ve kalınbağırsak tüketimiyle *S. Typhimurium*'un sebep olduğu gıda zehirlenme olgularının meydana geldiği belirtilmektedir (Sinell 1983, Cornell ve Neal 1998). Etkenin, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yılda yaklaşık bir milyon gıda kaynaklı vakaya ve 378 bireyin ölümüne sebep olduğu tahmin edilmektedir (Scallan ve ark. 2011). *Salmonella* spp.'nin 2007 yılında 2201 olgu ile Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde en sık rapor edilen (%39,2) gıda kaynaklı patojen olduğu, bunlardan 142'sinin Fransa'da meydana geldiği bildirilmiştir (EFSA 2009). Çin'de de gıda kaynaklı vakaların yüksek bir oranda (yaklaşık %70-80) *Salmonella* spp.'den kaynaklandığı kaydedilmiştir

(Wang ve ark. 2007). Hayvanların iç organları *Salmonella* spp.'nin yanı sıra, *L. monocytogenes* açısından da rezervuardır. Listeriosis, Avrupa'da en çok görülen dördüncü zoonotik hastalık olmakla birlikte, görülme oranının 100.000'de 0.41 olduğu kaydedilmiştir (Jamshidi ve Zineali, 2019).

Listeriosis vakaları Salmonellozis'e kıyasla nispeten daha nadir olsa da, yüksek bir mortalite oranına (%30) sahiptir (Broome ve ark. 1990; Berche 2005). Doğada yaygın olarak bulunan *L. monocytogenes*, gıda kaynaklı patojenler içerisinde buzdolabı sıcaklığında üreyebilmesi ile öne çıkan önemli bir mikroorganizmadır. Gıda kaynaklı patojenler içinde oldukça önemli bir role sahip olmasından dolayı son on yılda üzerinde en çok çalışılan konu olmuştur (Ryser ve Marth 2007).

Son yıllarda, antibiyotiklere dirençli patojen bakteriler, bir diğer halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (Rasschaert ve ark. 2020). Antibiyotik ajanlar, veteriner uygulamalarda sadece hastalıkları önlemede ve tedavi amaçlı değil, aynı zamanda gelişimi teşvik edici olarak da sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak, dünyada antibiyotiklerin yaygın bir şekilde kullanımı antimikrobiyal dirençli bakterilerin gelişimini teşvik etmektedir. Salmonellozis ve diğer bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan çok sayıdaki antibiyotik, veteriner hekimlik alanında, özellikle de kanatlı sektöründe sıklıkla kullanılmaktadır. Trimetoprim ve sülfonamid özellikle beta-laktam grubu antibiyotiklere alerjisi olan bireylerde ikinci seçenek tedavi olarak uygulanmaktadır. Vankomisin ve eritromisin, listeriosis tanısı konulan bakteriyemi dönemindeki hastalarda ve hamile kadınların tedavisinde sıklıkla kullanılan antibiyotiklerdir (Hernando ve ark. 2012). Rifamisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve florokinolonlar listeriosis olgularında kullanılan diğer antibiyotiklerdir (Allerberger ve Wagner 2010, Conter ve ark. 2009, Walsh ve ark. 2001). Florfenikol veteriner ilaçları arasında yer almakla birlikte, kanatlı sektöründe sıklıkla kullanılmaktadır (Sirinivasan ve ark., 2005).

Salmonella spp. ve *L. monocytogenes* gibi zoonotik bakterilerle kontamine olmuş gıda tüketimi sonucu insanlarda meydana gelen enfeksiyonlarda hatalı ve sık kullanım sebebiyle antibiyotiklere direnç kazanan bu türlerin ciddi bir halk sağlığı riski oluşturabileceği vurgulanmaktadır (White ve ark. 2002, Oliver ve ark. 2020). Hayvanlar tarafından dışarıdan alınan tüm kimyasal maddeler, metabolizmada çeşitli reaksiyonlara girerek vücutta birikebilmektedir. Bu birikim, maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine ve organın bağlama kapasitesine bağlı olmakla birlikte, başta karaciğer olmak üzere akciğer, beyin, böbrek, kemik dokuları gibi sakatat olarak ifade edilebilen tüm hayvansal organlarda olabilmektedir (Donoghue 2003, Nollet ve Toldra 2011). Bu ajanların, terapötik ve koruyucu amaçla aşırı kullanımı sonucu direnç kazanabilen patojen bakteriler gıda vasıtasıyla insanlara da geçebilmektedir (Su ve ark. 2004,

Tollefson ve Miller 2000, Guran ve ark. 2020). Özellikle, *Salmonella* cinslerindeki dirençlilik, küresel bir problem haline gelmiş, hayvansal gıda üretiminde antibiyotik ajanların kullanımıyla bağlantılı olarak, salmonellozise yakalanan insanlardan, artan oranlarda tek veya çoklu antibiyotik dirençli *Salmonella* cinslerinin izole edildiği kaydedilmiştir (Van Duijkeren ve Houwers 2000, Cohen ve ark. 2020). *Salmonella* cinslerinde antibiyotiklere karşı giderek artan oranda direnç geliştiği bilinmekte ve bunun en önemli sebebinin, büyümelerinin hızlanması amacı ile hayvanlara birçok antibiyotiğin uygulanması olduğu belirtilmektedir (White ve ark. 2002).

Gıda amaçlı üretilen hayvanlara uygulanan yüksek doz antibiyotiklerin dirençli türlerin gelişimine büyük oranda katkı sağladığı kaydedilmiştir. Söz konusu türlerin çoğalmasını, seleksiyonunu ve yayılımını engellemek amacıyla (EU 1831/2003) sayılı yönetmeliği ile AB ülkelerinde kullanımı hayvan yetiştiriciliğinde gelişimi teşvik edici antibiyotiklerin kullanımı yasaklanmakla birlikte (Fernandez ve ark. 2012), ABD, Kanada ve diğer birçok ülkede antibiyotiklerin gelişimi teşvik edici ve canlı ağırlık artışı sağlamak amacıyla kullanımına izin verilmektedir (Yıldırım ve ark. 2011, Glasgow ve ark. 2019). Yüksek tetrasiklin, klortetrasklin ve oksitetrasiklin direnci şaşırtıcı olmamakla birlikte, söz konusu antibiyotiklerin tavuk çiftliklerinde daha çok gelişimi teşvik edici (Soltan Dallal ve ark. 2010) ve terapötik ajan olarak en çok tercih edilen antibiyotikler arasında yer aldıkları rapor edilmiştir (Capita ve ark. 2007).

Bu çalışmada, tavuk içorganlarında *Salmonella* cinslerinin ve *L. monocytogenes*'in varlığı immunomagnetik seperasyon tekniği ile saptanarak, izolatların antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada kullanılan örnekler, 2015 yılının Haziran-Eylül aylarında her ay iki ya da üç parti halinde toplam 300 iç organ örneği (karaciğer, yürek, taşlık) olacak şekilde 4 aylık dönemde toplanmıştır. Afyon'da paketlenmeden ticari olarak (dökme tarzında) açık olarak satış yapan 6 farklı satış yerinden iç organ örneği satın alındı. Örnekler satın almayı takiben soğuk zincir altında laboratuvara getirildi. Aseptik şartlar altında *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* izolasyonu amacıyla 25'er gram tartıldıktan sonra Bacteriological Analytical Manual (BAM 2015, BAM 2016)'de belirtilen izolasyon prosedürleri uygulandı. *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. izolasyonu için zenginleştirmeyi takiben IMS tekniği kullanıldı.

Mikrobiyolojik Analizler

Listeria monocytogenes'in İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Ön zenginleştirme amacıyla, iç organ örnekleri 25 g tartılarak, 225 ml *Listeria* Enrichment Broth'ta

(University of Vermont- UVM I) 30°C'de 24-48 saat (Oxoid CM0863, Suppl SR0142) inkübe edildi. Daha sonra her bir zenginleştirme poşetinden 0,1 ml alınarak selektif zenginleştirme tüplerine (University of Vermont- UVM II) geçilerek 30°C'de 24 saat inkübe edildi. Selektif zenginleştirmeyi takiben IMS tekniği uygulandı. IMS işleminde Dynal MPC-S2 ile Dynal MX cihazı kullanıldı. Sulandırılmış bakteri-boncuk karışımından 50 µl alınarak ilgili besi yerlerine ekilerek inkübasyona bırakıldı. Resüspanse Dynabeads-*Listeria* kompleksinden 50 µl *Listeria* Selective Agar'a geçilerek (Oxoid-CM 856, Supl. SR 140, Basingstoke, England) plaklar 35°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Plaklarda üreyen etrafı siyah haleli, 1 mm çapında, ortası basık koloniler, %0.6'lık Yeast Extract ilave edilen Tryptic Soy Agar'a (%0.6 YE-TSYE-Oxoid CM 0131) geçildi. Plaklarda üreyen kolonilere Gram boyama, katalaz, oksidaz, metil red (MR), Voges Proskauer (VP), hareketlilik-indol ve nitrat redüksiyonu testleri uygulandı. Gram pozitif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, indol negatif, metil red pozitif, Voges Proskauer pozitif, nitrat redüksiyonu değişken olan ve şemsiye tarzında hareketlilik gösteren koloniler *Listeria* spp. olarak değerlendirildi. *Listeria* cinslerinin hemoliz tiplerini belirlemek amacıyla, şüpheli koloniler %5 defibrine koyun kanı ilave edilen Columbia Blood Agar'a geçildikten sonra 35°C'de 24-48 saat inkübe edildi ve hemoliz tipleri kaydedildi. Kanlı Agar'da etrafı açık renkli berrak zon oluşturan koloniler β-hemoliz olarak değerlendirildi. Son olarak, izolatlar Microbact *Listeria* 12L (Oxoid MB 1128, *Listeria* Identification System 12L) identifikasyon kiti ile doğrulandı.

Salmonella spp'nin İzolasyonu ve İdentifikasyonu

İki aşamalı zenginleştirme işlemi uygulandı. Ön zenginleştirmede Buffered Peptone Water (IPW) (Oxoid CM 0509), selektif zenginleştirmede RappaportVassiliadis Broth (42°C 24-48 saat) (Oxoid CM 0669), Selenite Cystine Broth (37°C 24 saat) (CM 0699) ve Tetrathionate Broth (37°C 24 saat) (Oxoid CM 0029) kullanıldı. Selektif zenginleştirmeyi takiben IMS tekniği uygulandı. Son olarak katı besi yerine ekim ve kolonilerin değerlendirilmesi yapıldı. IMS işlemi amacıyla Dynal MPC-S2 ile Dynal MX aleti kullanıldı. Bu amaçla vortekste homejenize edilen Dynabeads anti-*Salmonella* sıvısından 20 µl alınarak mikrosantrifüj tüplerine konuldu. Daha sonra 1'er ml zenginleştirme sıvılarından ayrı ayrı ilave edilip, tüplerin ağzı kapatıldı. Dynal MPC-S rakına yerleştirildi. Diğer işlemler prosedürde belirtildiği şekilde yapıldı. Resüspanse Dynabeads-*Salmonella* kompleksinden 50 µl alınıp, Brilliant Green Agar (Modified) (CM 0329, Suppl.SR 0087) ve XLD agara (Oxoid CM 0469) geçilerek plaklar 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Selektif zenginleştirme sıvısından Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose Agar ve Xylose Deoxycholate Agar'a geçilerek 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. BPLS Agarda

kırmızı zonlu pembe koloniler, XLD Agarda siyah merkezli kırmızı koloniler şüpheli olarak kabul edildi. Plaklarda üreyen kolonilere Gram boyama ve biyokimyasal testler (Katalaz, Oksidaz, Triple Sugar Iron Agar, Lysine Iron Agar, Üre Testi, Simmon Citrate Agar, VP, indol) uygulandı. Gram negatif, oksidaz negatif, katalaz pozitif, TSIA'da yüzeyde kırmızı dipte sarı siyah renk, LIA'da alkali (mor) ve H₂S pozitif, üre negatif, SC Agar'da prusya mavisi renk, VP negatif, indol negatif koloniler son olarak *Salmonella* antiserum (O ve H-Vi polyvalan antiserum, Difco 2264-47-2) ile doğrulandı.

Antibiyotik Duyarlılık Testi

Antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi, Walsh ve ark., (2001) ile NCCLS (2003) tarafından belirlenen disk diffüzyon yöntemine göre yapıldı. Bu amaçla Mueller-Hinton Agar (Oxoid CM 0337) kullanıldı. Antibiyotik diskleri, amoksisilin (25µ), florfenikol (30µ), enrofloksasin (5µ), trimetoprim/sülfadiazin (30µ), gentamisin (10µ), streptomisin (10µ), ampisilin (10), tetrasiklin (30µ), klortetrasiklin (30µ), oksitetrasiklin (30µ), penisilin (10IU)'den oluştu. İzolatların direnç düzeyleri (CLSI 2010) ve (Bauer 1996)'ya göre, duyarlı ve hassas olarak tanımlandı.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler Tam Kare Metodu'na göre yapıldı.

BULGULAR

Toplam 300 iç organ örneğinin 39'undan (%13) *Salmonella* spp. 8'inden (%2,6) *L. monocytogenes* izole edildi. *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* açısından en yüksek izolasyon oranı karaciğer (%74,4) ve taşlıktan (%62,5) elde edildi. *Salmonella* spp.'nin izole edildiği iç organ çeşidine göre, yürek örneklerinden 9 izolat, taşlık örneklerinden 1 izolat ve karaciğer örneklerinden 29 izolat elde edildi. *L. monocytogenes*'in iç organ çeşidine göre izolat sayıları sırasıyla; taşlıktan 5 adet, yürekten 2 adet ve karaciğerden 1 adet olarak belirlendi. İç organlara göre, *L. monocytogenes*'in izolasyon oranları istatistiksel olarak farklılık göstermezken ($p>0,05$), *Salmonella* spp.'nin izolasyon oranları istatistiksel olarak farklılık gösterdi ($p<0,001$). Buna göre etken, en çok karaciğerden izole edildi.

Elde edilen 39 adet *Salmonella* spp. izolatının tetrasiklin, klortetrasiklin ve oksitetrasiklin'e %100, penisilin'e %64,1 ampisilin'e %48,7, florfenikol'e %46,1, amoksisilin'e %43,5, streptomisin'e %26, enrofloksasin'e %15,3, trimetoprim/sülfadiazin'e %7,6 düzeyinde dirençli oldukları saptandı. *L. monocytogenes* izolatlarının (8) %62,5'inin tetrasiklin, klortetrasiklin, oksitetrasiklin ve trimetoprim/sülfadiazin'e, %50'sinin amoksisilin'e, florfenikol'e, %37,5'inin enrofloksasin'e, %25'inin ampisilin ve penisilin'e, %12,5'inin streptomisin'e dirençli olduğu belirlendi. *Salmonella* spp. ve *L.*

monocytogenes izolatlarının hiçbirinin gentamisin'e direnç geliştirmedikleri ve izolatların en az bir ve daha fazla antibiyotiğe çoklu dirençli oldukları belirlendi. *Salmonella* spp. izolatlarının (n=39) 6'sının (%15,38) amoksisilin ve florfenikol, 2'sinin (%5,1) enrofloksasin ve oksitetrasiklin, 2'sinin (%5,1) enrofloksasin ve klortetrasiklin, 3'ünün (%7,6) trimetoprim/sülfadiazin ve klortetrasiklin, 2'sinin (%5,1) streptomisin ve penisilin, 7'sinin (%17,9) ampisilin, tetrasiklin ve penisilin, 5'inin (%12,8) ampisilin ve tetrasiklin, 3'ünün enrofloksasin, amoksisilin ve florfenikole karşı çoklu direnç geliştirdiği belirlendi. *Listeria monocytogenes* izolatlarının (n=8) 1'i (%12,5) amoksisilin ve florfenikol, 1'i (%12,5) enrofloksasin oksitetrasiklin, tetrasiklin ve klortetrasiklin, 2'si (%25) penisilin ve florfenikol'e karşı çoklu direnç geliştirdiği saptandı

TARTIŞMA

Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonların sebepleri arasında ilk sıralarda yer alan *Salmonella* ve *L. monocytogenes*'in tavuk iç organlarındaki varlığı önem teşkil etmektedir. Ucuz bir protein kaynağı ve kolay erişilebilmesi bakımından sıklıkla tüketilen (Karou ve ark. 2013a, Kuan ve ark. 2013a) kanatlı iç organları (karaciğer, taşlık) *L. monocytogenes* varlığı açısından oldukça yüksek kontaminasyon oranına (%63) sahiptir. Söz konusu kontaminasyonun özellikle işlem sonrası şekillendiği rapor edilmiştir (Arumugaswamy ve ark. 1994). Özellikle hijyen şartlarının yeterince sağlanmadığı küçük çaplı gıda satış yerlerinde (gelişmekte olan ülkelerde genellikle geleneksel ürünlerin satıldığı), hazır olarak tüketime sunulan ve cadde üzerinde satılan gıdalarda çapraz kontaminasyonun arttığı kaydedilmiştir.

Farklı gıdalarda *L. monocytogenes* varlığına ilişkin pek çok çalışma mevcut olmasına rağmen, iç organlara ait sınırlı sayıda çalışmanın olması dikkat çekmektedir (Kuan ve ark. 2013a, Kuan ve ark. 2013b). Bu çalışmada elde edilen *L. monocytogenes* bulguları (karaciğer %12,5; yürek %25; taşlık %62,5) Inoue ve ark. (2000) (kıyma %12,2); Stonsaovapak ve ark. (2010) (tavuk karaciğeri %13,3); Alonso-Hernando ve ark. (2012) (kanatlı eti, %24 ila %32); Arumugaswamy ve ark. (1994) (parça tavuk %60, karaciğer %60 ve taşlık %62); Mena ve ark. (2004) (tavuk eti %60) ile paralel; Pesavento ve ark. (2010) (çiğ et ürünleri %3,15; Dhanashree ve ark. (2003) (et ve et ürünleri ve farklı gıdalar %17,5); Awaisheh (2009)'dan (tüketime hazır gıda %5) daha yüksek bulunmuştur. Belirlenen düzeylerin farklılık nedenleri arasında, işlem sonrası kontaminasyonlar, kanatlı kesim aşamalarındaki hijyen uygulamalarındaki farklılıklar, uygun olmayan gıda işleme yöntemleri, transport ve dağıtımda hijyenik olmayan konteynerlerin kullanılması, gıda üretimi ya da satışı yapan çalışanların taşıyıcı olması, uygun olmayan muhafaza sıcaklıkları, gıda işleme prosedürleri ve denetleme sistemlerinin yetersizlikleri yer almaktadır. *L. monocytogenes*'in buzdolabı

sıcaklığında canlı kalabilme ve çoğalabilme özelliğine sahip olması özellikle üretimden satışa kadar geçen sürede iç organlardaki düzeyin yükselmesine etki eden en önemli faktör olduğu bildirilmektedir (Kuan ve ark. 2013a).

Salmonella spp.'nin kanatlı bağırsağındaki düzeyinin %55 civarında olduğu bildirilmekte, salmonellozise yol açan gıdalar arasında ilk sıralarda yer alan tavuk eti ve kırmızı etin genellikle kesim sırasında iç organların çıkartılması aşamasında kontamine olduğu kaydedilmiştir (Huis in't Veld ve ark. 1994, Karou ve ark. 2013a). Bu çalışmanın bulguları (karaciğer %74,4; yürek %23,1; taşlık %2,6) diğer çalışma bulgularından yüksek (Roy ve ark. 2002, Kılınç ve Aydın 2006, Shelly ve ark. 2006, Abdellah ve ark. 2008, Abdellah ve ark. 2009, Ulloa ve ark. 2010, Karou ve ark. 2013a, Bonny ve ark. 2015, Sodagari ve ark. 2015, Jung ve ark. 2019) bir çalışmadan ise (Arroyo ve Arroyo 1995b) düşük bulunmuştur. Ayrıca, Brizioa ve Anthero (2013) soğutulmuş taşlık örneklerinin hiçbirinden *Salmonella* spp. izole edilmediğini bildirmiştir.

Salmonella spp.'nin prevalansına ilişkin sonuçların değişkenlik göstermesinin nedenlerinden ilki; örnek türlerindeki farklılıktır. İç organ örneklerinin incelendiği çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Çalışmalar çoğunlukla kanatlı karkas ve parça ürünlerinde odaklanmıştır. Kontaminasyon oranlarına etki eden diğer önemli faktör örnekleme metodlarıdır. Genellikle sadece klasik kültür tekniği ya da bunu takiben PCR tekniği uygulanan çalışmaların yanı sıra, klasik kültür tekniği ve IMS metodlarının kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. IMS metodunun analiz süresini kısaltması, hızlı, kolay ve spesifik ve geleneksel kültür metodlarından daha hassas olması (Reginato ve ark, 2002, Odumeru JA ve León-Velarde 2012) bulgular üzerine etkili faktörlerdir. Diğer etkenler arasında, örnekleme dönemleri, kanatlı kesiminde iç organ çıkartılırken meydana gelen çapraz kontaminasyonlar, son ürüne uygulanan muhafaza sıcaklığı sayılabilir. Buzdolabı sıcaklığının mikroorganizmalar üzerinde önemli baskılayıcı etkisinin olması önem arz etmektedir. Süpermarket ve benzeri satış yerlerinden toplanan örneklerin üretim sırasında alınan örneklerden daha düşük kontaminasyon oranına sahip olduğu bildirilmiştir. Bu durumun sebebi olarak, süpermarket ve diğer ticari satış yerlerinde ürünlerin kesintisiz olarak soğutulması gösterilmiştir (Abdellah ve ark. 2009, Ulloa ve ark. 2010). *Salmonella* spp. prevalansına etki eden diğer önemli faktörün coğrafi farklılık (Dong ve ark. 2014) ve mevsim olduğu bildirilmekte, ilkbahar ve yaz mevsimlerinde oranların nispeten daha yüksek olduğu kaydedilmektedir (Ulloa ve ark. 2010). Bulgulardaki farklılıklar örneklerin satın alındığı satış yerlerinde uygulanan hijyen standartlarına bağlanabilir. Uygun olmayan çalışma şartlarının yanı sıra, kesimin olduğu yerde ürün satışının da yapılması kontaminasyon oranlarında artışa sebep olmaktadır (Abdellah ve ark. 2008).

Bu çalışmada, *Salmonella* spp. izolatlarının (n=39) 6'sının (%15,38) amoksisilin ve florfenikol, 2'sinin (%5,1) enrofloksasin ve oksitetrasiklin, 2'sinin (%5,1) enrofloksasin ve klortetrasiklin, 3'ünün (%7,6) trimetoprim/sulfadiazin ve klortetrasiklin, 2'sinin (%5,1) streptomisin ve penisilin, 7'sinin (%17,9) ampisilin, tetrasiklin ve penisilin, 5'inin (%12,8) ampisilin ve tetrasiklin, 3'ünün enrofloksasin, amoksisilin ve florfenikole karşı çoklu direnç geliştirdiği belirlendi. *Salmonella* spp., izolatlarında en yüksek dirençlilik tetrasiklin, klortetrasiklin ve oksitetrasiklin'de (%100) gözlenmiş, bunu %64,1 ile penisilin, %48,7 ile ampisilin, %46,1 ile florfenikol ve %43,5 ile amoksisilin takip etmiştir. Belirlenen yüksek orandaki tetrasiklin (Karou ve ark. 2013b, Temelli ve ark. 2012, Padungtod ve Kaneene 2006), oksitetrasiklin (Abd-Elghany ve ark. 2015, Oral 2008) ve streptomisin (Fernandez ve ark. 2012, Abdellah ve ark. 2009) direnci birçok çalışma ile uyum göstermektedir. Çeşitli çalışmalar (Parveen ve ark. 2007, Hur ve ark. 2010, Pan ve ark. 2010, Shrestha ve ark. 2010, Yang ve ark. 2010, Cohen ve ark. 2020) izolatların en az beş ila on beş antibiyotiğe dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Bu bulgular tavukların çoklu direnç gösteren *Salmonella* cinslerinin ana rezervuarı olduğunu doğrulamaktadır. Bu durum kanatlı eti ve ürünlerinden kaynaklanan salmonellozis olgularındaki antibakteriyel tedavinin başarısına ulaşmasındaki zorluklara açıklık getirmektedir.

Bu çalışmada tetrasiklin, klortetrasiklin ve oksitetrasiklin'e karşı belirlenen yüksek düzeydeki direnç (%100) söz konusu antibiyotiklerin çalışmanın yapıldığı bölgedeki tavuk çiftliklerinde terapötik ajan olarak sıklıkla kullanılmış olmasıyla açıklanabilir. Beta laktam antibiyotiklerden penisilin grubunda yer alan ampisilin, özellikle yetişkinlerde, salmonellozis tedavisinde uzun zamandır kullanılmaktadır. Fakat son yıllarda söz konusu antibiyotiğe karşı direncin gelişmesi nedeniyle bu antibiyotiğin yerine yetişkinlerde florokinolon grubu, çocuklarda ise daha çok sefalosporin grubu tercih edilmektedir (Miranda ve ark. 2009, Andersson ve ark. 2020). Bu çalışmada, nispeten düşük düzeyde ampisilin (%48,7) direncinin gözlenmesi, gıda üretimi için yetiştirilen hayvanlarda terapötik ajan olarak daha az tercih edilmesine atfedilebilir. Bu çalışmada, florokinolon grubu antibiyotik olan enrofloksasin'e düşük düzeyde (%15,3) direnç gözlenmiştir. Yine gentamisine direnç gözlenmemesi ve streptomisine düşük düzeyde (%26) direnç tespit edilmesi ümit verici bir durum olarak kabul edilebilir. Çünkü; florokinolonların, penisilin, amoksisilin, streptomisin ve gentamisin'in insanlardaki salmonellozis enfeksiyonlarında sıklıkla tercih edilen antibiyotikler olduğu bildirilmektedir (Fernandez ve ark. 2012; Hur ve ark. 2012). Fakat belirlenen yüksek düzeyde penisilin (%100) ve orta düzeyde (%43,5) amoksisilin dirençliliği önemli derecede endişe verici bir durum olarak görülmektedir. Bu çalışmada florfenikol'e nispeten yüksek düzeyde (%46) direnç belirlenmiştir.

Antibiyotik kullanımının, mikroorganizma toplulukları (resistom) tarafından kodlanan antibiyotik dirençlilik genlerini değiştirebileceği ve antibiyotik kullanımı kesildikten onlarca yıl sonra bile resistomlar üzerinde etkisinin sürebileceği kaydedilmiştir (Sommer ve Dantas 2011). Bir bakterinin antibiyotik direnç genini pek çok farklı yolla bakteri türlerine yayabildiği bilinmektedir (White ve ark. 2002). Florfenikol ve trimetoprim/sülfadiazin her ne kadar sadece hayvan sağlığında kullanılan antibiyotikler olsa da, elde edilen *Salmonella* spp., izolatlarının florfenikol'e orta (%46,1), trimetoprim/sülfadiazin'e ise düşük düzeydeki (%7,6) dirençlilikleri söz konusu sebeplerden dolayı endişe vericidir.

Bu çalışmada elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının (8) %62,5'inin tetrasiklin, klortetrasiklin, oksitetrasiklin ve trimetoprim/sülfadiazin'e, %50'sinin amoksisilin ve florfenikol'e, %37,5'inin enrofloksasin'e, %25'inin ampisilin ve penisilin'e, %12,5'inin streptomisin'e dirençli olduğu belirlenirken, gentamisin direnci saptanmamıştır. *Listeria monocytogenes* izolatlarının (n=8) 1'i (%12,5) amoksisilin ve florfenikol, 1'i (%12,5) enrofloksasin oksitetrasiklin, tetrasiklin ve klortetrasiklin, 2'si (%25) penisilin ve florfenikole karşı çoklu direnç geliştirdiği belirlendi. *Listeria* spp.'nin çoklu ilaç dirençliliği birçok araştırmada vurgulanmıştır. Birçok çalışmada (Pesavento ve ark. 2010, Sakaridis ve ark. 2011, Alonso-Hernando ve ark. 2012, Rahimi ve ark., 2012) en az bir ve daha fazla antibiyotige direnç gösterdikleri kaydedilmiştir. İnsanlarda gözlenen listeriosis olgularında, ampisilin ve penisilin tek ya da gentamisinle kombine bir şekilde tercih edilen ilaç grubudur. Ayrıca, pensilin/ampisilin kombinasyonu da sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat *Listeria* spp.'nin pensiline karşı giderek duyarlılığının azaldığı bildirilmektedir (NCCLS 2003). Elde edilen izolatlarda, listeriosis tedavisinde kullanılan (eritromisin, enrofloksasin, penisilin, ampisilin, streptomisin, gentamisin) antibiyotiklere yüksek oranda direnç gözlenmezken, tetrasiklin, klortetrasiklin, oksitetrasiklin ve trimetoprim/sülfadiazin, amoksisilin ve florfenikol'e kayda değer bir direnç gözlenmiş, gentamisine ise duyarlılık belirlenmiştir.

SONUÇ

Bu çalışma, Türkiye'de *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes*'in tavuk iç organlarında bulunuşunu birkaç sebep altında toplamamızı sağlamıştır. Her şeyden önce hayvan sağlığı üretim aşamasında korunmalıdır. Antibiyotik kullanımının kesimden önce yasak olması sebebiyle içme sularında ya da yemde organik asit ve probiyotik kullanımına önem verilmelidir. Ancak, bunların yemde kullanımı peletleme sebebiyle kısıtlıdır ve kullanılacak probiyotik suşların su sistemlerinde biyofilm oluşturmaması gerekmektedir. *Salmonella* ve *Listeria* cinslerinin belirlenmesi kapsamında resmi kurumlar

tarafından laboratuvar analizlerinin daha sık yapılması sağlanmalıdır. *Salmonella* türlerine ilişkin koruma programı oluşturulmalı ve B sınıfına düşen ürünler devlet tarafından sübvansede edilmelidir. Çalışmamıza konu olan iki bakterinin oluşturduğu ekonomik kayıplar resmi kurumlar tarafından dikkate alınmalı ve satış yerlerinin kontrolleri sıklaştırılmalıdır. Çiftlikten sofraya gıda güvenliğini sağlamak için, yumurtacı sürülerinin *Salmonella* Enteritidis'e karşı aşılınmaları yasal hale getirilmelidir. Gıda Güvenliği Sistemlerinin uygulanmadığı durumlarda caydırıcı cezai işlemler uygulanmalıdır.

Açıklama: Bu çalışma NWSA 2nd International Science Symposium, Science Festival, Tbilisi, GEORGIA, (2017) kongresinde sözlü olarak sunulmuştur.

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

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

Finansal Destekler: Bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 13 SAĞBİL 06 proje numarası ile desteklenmiştir.

REFERENCES

- Abd-Elghany SM, Sallam KI, Abd-Elkhalek A, Tamura T.** Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. *Epidemiol Infect.* 2015; 143(5): 997-1003.
- Abdellah C, Fouzia RF, Abdelkader C, Rachida SB, Mouloud Z.** Occurrence of *Salmonella* in chicken carcasses and giblets in Meknes-Morocco. *Pakistan J Nutri.* 2008; 7(2): 231-233.
- Abdellah C, Fouzia, RF, Abdelkader C, Rachida SB, Mouloud Z.** Prevalence and anti-microbial susceptibility of *Salmonella* isolates from chicken carcasses and giblets in Meknes, Morocco. *African J Mic Res.* 2009; 3(5): 215-219.
- Allerberger F, Wagner M.** Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(1): 16-23.
- Alonso-Hernando A, Prieto M, Garcia-Fernandez C, Alonso-Calleja C, Capita R.** Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control.* 2012; 23: 37-41.
- Andersson D, Balaban N, Baquero F, Courvalin, P, Glaser P.** Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality, *FEMS Microbiol Rev.* 2020; 44(2): 171-188.
- Arroyo G, Arroyo JA.** Detection of *Salmonella* serotypes in edible organ meats from markets in Madrid, Spain. *Food Microbiol.* 1995a; 12: 13-20.
- Arroyo G, Arroyo JA.** Efficiency of different enrichment and isolation procedures for the detection of *Salmonella* serotypes in edible offal. *Journal of Applied Bacteriology,* 1995b; 79(4): 360-367.
- Arumugaswamy RK, Rahamat Ali GR, Abd Hamid SN.** Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods in Malaysia. *Int J Food Microbiol.* 1994; 23(1): 117-121.
- Awaishah SS.** Survey of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp., contamination in different common ready-to-eat food products in Jordan. *Pakistan J Biol Sci.* 2009; 12(23): 1491-1497.
- BAM Bacteriological Analytical Manual,** Food and Drug Administration *Salmonella*, 8 th Ed., AOAC International, USA. 2015.
- BAM Bacteriological Analytical Manual,** Food and Drug Administration, Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods, Chapter, 10. 2016.
- Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1996; 45: 493.
- Berche P.** Pathophysiology and epidemiology of listeriosis. *Bull L'Acad Natl Med.* 2005; 189(3): 507-16.
- Brizioa P, Antheroa G.** Moela de frango: Estudo da Prevalencia de *Salmonella* spp. *Rev Brasil Pesquisa Alimentos.* 2013; 4(2): 66-68.
- Broome J.** Fairness proceedings of the Aristotelian Society. 1990; 91: 87-101.
- Bonny, AC, Karou GT, Francine Ake MD, Dadie AT, Bohoua LG, Niamké SL.** Distribution of serovars and antibiotic resistance genes of *Salmonella* isolated from chicken gizzards in Abidjan, Côte d'Ivoire International J Innov App Studies, 2015; 11(3): 567-578.
- Capita R, Calleja CA, Prieto M.** Prevalence of *Salmonella* enterica serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain. *J App Microbiol.* 2007; 103:1366-1375.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement, M100-S20; 2010.
- Cohen E, Davidovich M, Rokney A, Valinsky L, Rahav G, Mor O.** Emergence of new variants of antibiotic resistance genomic islands among multidrug-resistant *Salmonella* enterica in poultry. *Environ Microbiol.* 2020; 22 (1): 413-432.
- Conter M, Paludi D, Zanardi E, Ghidinis, Vergara A, Ianieri A.** Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *Int J Microbiol.* 2009; 128: 497-500.
- Cornell J, Neal KR.** Protracted outbreak of *Salmonella* Typhimurium definitive phage type 170 food poisoning related to tripe, 'pig bag', and chitterlings. *Commun Dis Public Health.* 1998; 1: 28-30.
- Çolak NB, Hampikyan H.** İstanbul piyasasında satışı sunulan sakatatlarda bazı anabolizan kalıntılarının mevcudiyeti üzerine bir çalışma. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg.* 2005; 31 (1): 83-92.
- Dhanashree B, Otta SK, Karunasagar I, Goebel W, Karunasagar I.** Incidence of *Listeria* spp. in clinical and food samples in Mangalore, India. *Food Microbiol.* 2003; 20: 447-453.
- Diane G, Newell A, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langelaar M, Threfall J, Scheutz F, Van Der Giessen J, Kruse H.** Food-borne diseases. The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol.* 2010; 139: 3-15.
- Dong P, Zhu L, Mao Y, Liang R, Niu L, Zhang Y.** Prevalence and profile of *Salmonella* from samples along the production line in Chinese beef processing plants. *Food Control.* 2014; 38: 54-60.
- EFSA.** <http://www.europa.eu/en/efsajournal/doc/271r.pdf>. (Erişim Tarihi: Ağustos, 2014). European Food Safety Authority The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007; 2009
- FAO.** <http://www.fao.org>. 2013. (Erişim Tarihi: 15.05.2013) Food And Agriculture Organization of The United Nations.
- Fernández EA, Calleja, AC, Fernández GC, Capita R.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *Int J Food Microbiol.* 2012; 153: 281-287.
- Glasgow L, Forde M, Bro, D, Mahone YC, Fletcher S.** Antibiotic use in poultry production in Grenada. *Vet Med Int.* 2019; 1-7.
- Guran H, Çiftçi R, Gürsoy N, Özekinci T, Alalı W.** Prevalence of antibiotic-resistant *Salmonella* in retail organic chicken. *British Food J.* 2020; 1238-1251.
- Hernando AA, Prieto M, Fernandez CG, Calleja CA, Capita R.** Increase over time in the prevalence of multiple

- antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control*. 2012; 23: 37-41.
- Hur J, Kim JH, Park JH, Lee YJ, Lee JH.** Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strain isolated from poultry. *The Vet J*. 2010; 189: 306-311.
- Huis In't Veld JHJ, Mulder RWA, Snijders JMA.** Impact of animal husbandry and slaughter technologies on microbial contamination of Meat: Monitoring and Control, *Meat Science*. 1994; 36: 123-154.
- Inoue S, Nakama A, Ara Y, Kokubo Y, Maruyama T, Saito A, Yoshida T, Terao M, Yamamoto S, Kumagai S.** Short communication: prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. *Int J Food Microb*. 2000; 59: 73-77.
- Jamshidi A, Zeinali.** Significance and characteristics of *Listeria monocytogenes* in poultry products. *Int J Food Sci*. 2019; 1-7.
- Jung Y, Porto Fett A, Shoyer B, Luchansky J.** Prevalence, levels, and viability of *Salmonella* in and on raw chicken livers, *J Food Prot*. 2019; 82 (5): 834-843.
- Karou GT, Bonny AC, Ouattara GH, Dadie AT, Ahonzoniamke SL.** Prevalence of *Salmonella* and microbial resistance of serovars in retail chicken gizzards. *Int J Med App Sci*. 2013a; 2 (4): 223-233.
- Karou GT, Quattara H, Bakayoko S.** Prevalence of *Salmonella* and distribution of serovars isolated from retail raw chicken gizzard in Abidjan, Cote D'ivoire. *Octa J Biosci*. 2013b; 1(2): 115-121.
- Kılınc Ü, Aydın F.** Kayseri yöresindeki tavukçuluk işletmelerinden toplanan tavuklardan izole edilen *Salmonella* türlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları. *Sağ Bil Derg*. 2006; 15(1) 35-40.
- Kuan CH, Wong WC, Pui CF, Mahyudin NA, Tang JYH, Nishibuchi, M, Radu S.** Prevalence and quantification of *Listeria monocytogenes* in beef offal at retail level in Selangor, Malaysia. *Brazil J Microbiol*. 2013a; 44(4): 1169-1172.
- Kuan CH, Goh, SG, Loo YY, Chang WS, Lye YL, Puspanadan S, Tang JYH, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Mahyudin NA, Radu S.** Prevalence and quantification of *Listeria monocytogenes* in chicken offal at the retail level in Malaysia. *Poultry Sci*. 2013b; 92: 1664-1669.
- Mena C, Almeida G, Carneiro L, Teixeira P, Hogg T, Gibbs PA.** Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal, *Food Microbiol*. 2004; 21: 213-216.
- Miranda JM, Mondragón AC, Martinez, B, Guarddon M, Rodriguez JA.** Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *J Food Protec*. 2009; 5: 926-1138.
- Molla B, Mesfin A.** A survey of *Salmonella* contamination in chicken carcass and giblets in Central Ethiopia. *Revue Med Vet*. 2003; 154(4): 267-270.
- Molla B, Mesfin A, Alemayehu D.** Multiple antimicrobial-resistant *Salmonella* serotypes isolated from chicken carcass and giblets in Debre Zeit and Addis Ababa, Ethiopia. *Ethiop J Health Dev*. (2003a); 17(2): 131-149.
- NCCLS.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 8 th Ed., Pennsylvania, USA. 2003.
- Nollet LML, Toldra F.** Handbook of Analysis of Edible Animal By-Products. CRC Press, Taylor and Francis Group, NW, USA. 2011.
- Odumeru JA, León-Velarde CG.** *Salmonella* detection methods for food and food ingredients, In: *Salmonella- a dangerous foodborne pathogen*, Ed; Barakat Mahmoud SM, Rijeka JT, Croatia. 2012; pp. 373-392.
- Okorie-Kanu J, Madubuike A, Ezenduka E, Mgebehuruike A.** Occurrence and antibiogram of *Listeria* species in raw pork, beef, and chicken meats marketed in Enugu State, Southeast Nigeria, *Vet World*. 2020; 13(2): 317-325.
- Oliver J, Gooch C, Lansing S, Schueler J, Hurst J.** Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems. *J Dairy Sci*. 2020; 103(2): 1051-1071.
- Oral AI** Tavuk iç organlarında *Salmonella* Enteritidis'in izolasyonu ve izole edilen suşların antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi. Adnan Menderes Üniv Sağ Bil Enst, Yüksek Lisans Tezi. 2008.
- Pan ZM, Geng SZ, Ahou YQ, Liu ZY, Fang Q, Liu BB, Jiao XA.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp., isolated from domestic animals in eastern China. *J Animal Vet Adv*. 2010; 9: 2290-2294.
- Padungtod P, Kaneene JB.** *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. *Int J Food Microbiol*. 2006; 108: 346-354.
- Parveen S, Taabodi M, Schwarz JG, Oscar TP, Harter-Dennis J, White DG.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from processed poultry. *J Food Protec*. 2007; 70: 2466-2472.
- Pesavento G, Ducci B, Nieri D, Comodo N, Lo Nostro A.** Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control*. 2010; 21: 708-713.
- Rahimi E, Farzad Y, Farzinezhadizadeh H.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from different types of raw meat in Iran. *J Food Protec*. 2012; 12: 2100-2304.
- Reginato A, Pinheiro, Do Nascimento V, Oliveira M, Ruschel L, Da Silveira L.** Utilization of immunomagnetic separation for detection of *Salmonella* in raw broiler parts. *Braz J Microbiol*. 2002; 33: 339-341.
- Roy P, Dhillon AS, Lauerman LH, Schaberg DM, Bandli D, Johnson S.** Results of *Salmonella* Isolation from poultry products, poultry, poultry environment, and other characteristics, *Am Assoc Avian Pathol*. 2002; 46(1): 17-24.
- Ryser ET, Marth EH.** *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 3 th Ed., Taylor and Francis Group, Crc Press, Sound Parkway NW. 2007.
- Soltan Dallal MM, Doyle MP, Rezadehbashi M, Dabiri H, Sanaei M, Modarresi S, Bakhtiari R, Sharify K, Taremi M, Zali MR, Sharifi-Yazdi MK.** Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp., isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. *Food Control*. 2010; 21: 388-392.
- Sakaridis I, Soutos N, Iossifidou E, Papa A, Ambrosiadis I, Koidis P.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated in chicken slaughterhouses in Northern Greece. *J Food Protec*. 2011; 6: 872-1040.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL.** Foodborne illness acquired in the United States major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17: 7-15.
- Seong PN, Ch SH, Park KM, Kang GH, Park BY, Moon SS, Ba HV.** Characterization of chicken by-products by mean of proximate and nutritional compositions. *Korean J Food Sci An*. 2015; 35(2) 179-188.
- Shelly R, Abiodun A, Zinora A, William S.** Occurrence of selected foodborne pathogens on poultry and poultry giblets from small retail processing operations in Trinidad. *J Food Protec*. 2006; 5: 1096-1105.
- Shrestha A, Regmi P, Dutta RK, Khanal DR, Aryal SR, Thakur RP, Karki D, Singh UM.** First report on

antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry in Nepal. *Vet Microbiol.* 2010; 144: 522-524.

- Sinell HJ.** Microflora of edible offal with particular reference to *Salmonella*. In: Kiss I, Deak T, Incze K, Ed., *Microbial Associations and Interactions in Food*. 12th International IUMS-ICFMH Symposium, Budapest, Hungary. 1983; pp. 37-42.
- Sodagari HR, Mashak Z, Ghadimianazar A.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from retail chicken meat and giblets in Iran. *J Infect Dev Ctries.* 2015; 9(5): 463-469.
- Sommer Morten OA, Dantas G.** Antibiotics and the resistant microbiome. *Cur Opin Microbiol.* 2011; 14: 556-563.
- Stonsaovapak S, Boonyaratanakornkit B.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species in food products in Bangkok, Thailand, *J Food Safety.* 2010; 30: 154-161.
- Su LH, Chiu, CH, Chu CS, Ou JT.** Antimicrobial resistance in non typhoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 546-551.
- Temelli S, Kahya S, Eyigor A, Çarlı KT.** Antibiotic resistance phenotypes of *Salmonella* isolates of broiler meat and chicken origin. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2012; 59: 107-114.
- Tollefson LM, Miller A.** Antibiotic use in food animals: controlling the human health impact, *J AOAC Int.* 2000; 83(2): 245-254.
- Tonbak F, Atasever M, Çalıcıoğlu M.** Kanatlı etlerinde *Salmonella* riski. *Atatürk Üniv Vet Bilim Derg.* 2017; 12(1): 90-8.
- Ulloa J, Gonzalez M, Hernandez C, Villanueva MP, Fernandez H.** *Salmonella* Enteritidis in chicken carcasses and giblets in Southern Chile. *J Infect Dev Ctries.* 2010; 4(2): 107-109.
- Van Duijkeren E, Houwers DJ.** A critical assessment of antimicrobial treatment in uncomplicated *Salmonella* Enteritidis. *Vet Microbiol.* 2000; 73: 61-75.
- Walsh D, Duffy G, Sheridan JJ, Blair, IS, McDowell DA.** Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes* in retail foods. *J Appl Microbiol.* 2001; 90: 517-22.
- Wang J, Zheng RZ, Wang JY.** Risk assessment of *Salmonella* in animal derived food. *Clin J Animal Quarantine.* 2007; 24: 23-25.
- White DG, Zhao S, Simjee S, Wagner DD, Mcdermott PF.** Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes Infect.* 2002; 4(4): 405-412.
- Yang B, Qu D, Zhang X, Shen J, Cui S, Shi Y, Xi M., Sheng M, Zhi S, Meng J.** Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of market place in Shaanxi, China. *Int J Food Microbiol.* 2010; 141:63-72.
- Yıldırım Y, Gonulalan Z, Pamuk S, Ertas, N.** Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. on raw chicken carcasses. *Food Res Int.* 2011; 44: 725-728.

Economic Losses Associated with Fertility in Dairy Farms

İbrahim GÜLTEKİN¹, Mustafa TEKERLİ^{2*}

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

²Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Science, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

ABSTRACT

This investigation aimed to determine the effects of some environmental factors on fertility traits and economic losses caused by deviations from the ideal levels of these parameters.

The records of 126 Holstein and Simmental first-calf heifers from three dairy cattle enterprises in Afyonkarahisar during the period 2010 – 2016 were examined. The technique ANOVA were used to detect the effects of different environmental factors and fertility related economic losses were calculated.

The ages at first calving and services per conceptions were determined as 872.6 - 949.2 and 1.74 - 1.47 days in Holsteins and Simmentals. The effect of the year on services per conception was significant ($p < 0.05$). Calving intervals were found to be 430.7 to 404.6 days, respectively. The average economic losses of farms caused by deviations from the ideal levels in age at first calving and first calving interval calculated in terms of calf losses (head) were in the ranges of 15.56 – 24.55 and 3.41 – 8.73 heads. These facts suggested that the deviations from the ideal levels in these traits could be unnoticed or ignored by the enterprise managers and reach to economically remarkable levels. The need for every farm operation must conduct its own economic analysis was unveiled consequently.

Keywords: Environmental factors, Economic losses, Fertility, Holstein, Simmental.

Süt Sığırcılığı İşletmelerinde Döl Verimi ile İlişkili Ekonomik Kayıplar

ÖZ

Döl verimi, süt işletmelerinin karlılığının önemli bir göstergesidir. Bu araştırma, bazı çevresel faktörlerin döl verimi özellikleri üzerindeki etkilerini ve bu parametrelerin ideal düzeylerinden sapmaların neden olduğu ekonomik kayıpları belirlemek amacıyla yapılmıştır.

2010- 2016 yılları arasında Afyonkarahisar ilindeki üç süt sığırcılığı işletmesinde yetiştirilen 126 Holştayn ve Simental ırkı ilkine buzağılayan düvenin kayıtları incelenmiştir. Farklı çevresel faktörlerin etkilerini tespit etmek için ANOVA tekniği kullanılmış ve döl verimine bağlı ekonomik kayıplar hesaplanmıştır.

İlk buzağılama yaşı Holştayn ve Simental ırklarında 872,2 ile 949,2 gün olarak belirlenmiştir. En küçük kareler ortalamaları, Holştayn ve Simental gebelik başına tohumlama sayısının 1.74 ve 1.47 olduğunu göstermiştir. Varyans analizleri, bu özellikteki etkisinin anlamlı olduğunu ortaya koymuştur ($p < 0.05$). Holştayn ve Simental buzağılama aralıkları 430,7 ile 404,6 gün arasında bulunmuştur. Çevresel faktörlerin buzağılama aralığı üzerindeki etkisi önemsiz olmuştur. İlk buzağılama yaşı ve ilk buzağılama aralığındaki ideal düzeylerden sapmaların sebep olduğu ortalama ekonomik kayıpların bireysel buzağı kaybı (baş) cinsinden karşılıklarının 15.56- 24.55 ve 3.41- 8.73 baş aralığında olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, ideal seviyelerden sapmaların işletme yöneticileri tarafından fark edilmeyebileceğini veya göz ardı edilebileceğini ve ekonomik olarak dikkat çekici seviyelere ulaşabileceğini göstermiştir. Her çiftliğin kendi ekonomik analizini yapması gerektiği ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Çevresel faktörler, Döl verimi, Ekonomik kayıplar, Holştayn, Simental.

To cite this article: Gültekin İ. Tekerli M. Economic Losses Associated with Fertility in Dairy Farms. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):210-216

Submission: 11.02.2021 Accepted: 25.03.2021 Published Online: 04.05.2021

ORCID ID; İG: 0000-0003-4039-3550, MT: 0000-0002-8634-1193

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

INTRODUCTION

While the improvement of the genetic structure occurs in a long time, the environmental readjustments show its effects in a short time. Different researchers (Akbulut, et al. 1992, Ray et al. 1992, Silva et al. 1992, Çilek and Tekin 2005, Wathes et al. 2020) reported that the feeding and management in herd, calving year and season, age, diseases, and hygiene were important for production and reproduction. Regular business management, pedigree and yield recording are obligatory to achieve the target. Recording of various milk and fertility parameters and their deviations from the economic values are also important for an optimal animal breeding. The inadequate assessment of the potential and the losses caused by various reasons particularly effects on Holstein breeders in semi-arid regions of Turkey. Some problems such as low milk yield, low fertility and mastitis that can be solved managerial adjustments are result in culling of cows from the herds in their early lives. Cows can remain in the herd for a longer period by improving the environment. This also increases profitability (Mundan and Karabulut 2008).

Dairy cattle breeding should be done technically. Otherwise, small mistakes can turn into major harms. Ideally, cows must give birth a calf once a year, to be lactated for 10 months, stay in a dry period for 60 days before birth and be inseminated within an appropriate service period to provide an economical production. Cows must be pregnant at the 85th inspection after birth (Tahtabiçen 2008). Age at first calving, services per conception and calving interval were found in the ranges of 26 - 41 months, 1.47 - 1.69 services, 12.43 - 17.30 months by some researchers (Kumuk et al. 1999, Çilek and Tekin 2005, Kaygisiz and Elmaz 2008, Bayrıl and Yılmaz 2010) for Holsteins.

Increasing the number of cows in a herd is not a solution for a successful business. An unsuccessful management and poor quality of work force prohibit the growth and profitability of the operation. In this connection, Holstein cows can be inseminated for the first time when they reach about 340 kg weight and 14 - 16 months of age. The first calving should be in 23 - 25 months. Otherwise, financial losses will be inevitable. Ata (2013) reported that a one-day delay in the age at first calving and the calving intervals exceeding 365 days corresponded to ₺2.4 and ₺1.6 daily losses. Small cost increases may result in some unprecedented economic losses (Ali et al. 2013, Yılmaz et al. 2018, Ayvazoğlu et al. 2019).

Determination of the effects of some environmental factors on fertility traits and economic losses caused by deviations from the ideal levels of these parameters were targeted in this research.

MATERIALS and METHOD

Regular reproductive performance data of 126 Holsteins and Simmental first-calf heifers registered to Afyonkarahisar Provincial cattle breeders' Association were used in the study. The farm operations under study coded as A, B and C. Animals scattered as 58 and 27 Holsteins in farm A and B and 41 Simmentals in Farm C. The commercial feeding and management rules were generally applied in the enterprises. A total of 207 artificial insemination records taken from 2010 to 2016 were processed in the analyses. The age at first calving (AFC), calving interval (CI) and services per conception (SPC) were used as fertility traits. The target values of these criteria were accepted as 730 days for AFC, 365 days for CI and 1 for SPC, respectively according to the report of Uygur (2004). The observed values in respect of related criteria were determined for each cow, and then the differences between the actual and the target values were calculated.

In determination of the lost monetary amount, the cost of deviations from the ideals were calculated in line with the reports of Kumuk et al. (1999) and the losses were determined in terms of calf count for AFC and CI and number of services for SPC.

The approximate calf costs and artificial insemination prices (₺3,960 or \$741.43) per calf and, (₺75 or \$14.04) per service were calculated according to Afyonkarahisar Commodity Exchange daily stock bulletin dated January.01.2019. and the real market research. The effects of different environmental factors on reproductive traits were analyzed by the following statistical models:

$$Y_{ijklm} = \mu + G_i + YS_j + SS_k + AS_l + F_{m(i)} + \epsilon_{ijklmn} \text{ for Services per conception (SPC)} \quad (1)$$

$$Y_{ijklm} = \mu + G_i + CY_j + CS_k + CA_l + F_{m(i)} + \epsilon_{ijklmn} \text{ for Calving interval (CI)} \quad (2)$$

Where, Y_{ijklm} is the observation of the analyzed fertility trait (SPC and CA) of m^{th} animal of i^{th} genotype, j^{th} year of service / calving year, k^{th} season of service / calving season, l^{th} age of service / calving age, m^{th} farm within genotype. ϵ_{ijklmn} is the random residual error accepted to be NID (0, σ^2). The calving seasons in the model were divided into four groups in the form of winter, spring, summer, and fall. Cows younger than 26 months of age were grouped as the first and those equal to or greater than 26 months as the second group. The season of service was grouped into winter, spring, summer, and fall. Age of service per cow grouped as younger than 18 months (I) and 18 months or older (II). Microsoft Excel (2016) and Minitab 18 (2017) software were used for data processing and ANOVA.

RESULTS and DISCUSSION

Descriptive statistics for age at first calving were presented in Table 1. The results of ANOVA for SPC

and CI, the least-squares means, and the losses caused by the deviations of traits from the ideals in each farm operation were given in the tables (2 – 8).

Table 1: Descriptive statistics for first calving age in different breeds and farms.

Factors	Groups	n	Mean (days)	(S _̄)	CV (%)	Sum	Min.	Max.
Age at first calving		126	897.5	19.0	23.79	113089.0	650.0	1840.0
Genotype								
	Holstein	85	872.6	23.0	24.27	74173.0	650.0	1840.0
	Simmental	41	949.2	32.9	22.17	38916.0	688.0	1496.0
Farm Operation								
	Farm A	58	828.2	19.4	17.88	48037.0	691.00	1141.0
	Farm B	41	949.2	32.9	22.17	38916.0	688.0	1496.0
	Farm C	27	968.0	55.4	29.75	26136.0	650.0	1840.0

Table 2: ANOVA for Services per Conception.

Factors	D.F	Sum of Squares	Means Squares	F-Value	P-Value
Genotype	1	1.7357	1.73572	3.13	0.079
Year of services	2	4.6904	2.34518	4.23	0.017
Season of service	3	0.2846	0.09486	0.17	0.916
Age of service	1	0.6415	0.64150	1.16	0.284
Farm nested in genotype	1	0.9472	0.94717	1.71	0.194
Error	117	64.8082	0.55392		
Total	125	74.9286			

Table 3: Least-squares means for services per conception.

Factors	n	SPC
μ	126	1.6081±0.0871
Genotype		
	Holstein	85 1.7455±0.0971
	Simmental	41 1.471±0.133
Year of service		
	2013	19 1.432±0.216 ^b
	2014	49 1.909±0.116 ^a
	2015	58 1.483±0.134 ^b
Season of service		
	Winter	18 1.575±0.192
	Spring	34 1.538±0.133
	Summer	56 1.618±0.125
	Fall	18 1.702±0.195
Age of service		
	Group I	64 1.526±0.127
	Group II	62 1.691±0.104
Farm nested in genotype		
	Farm A (Holstein)	58 1.588±0.156
	Farm C (Holstein)	27 1.903±0.153
	Farm B (Simmental)	41 1.471±0.133

Different letters (a, b, and c) are significantly different at 0.05 level.

Table 4: ANOVA results for Calving Interval.

Factors	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F-value	P-value
Genotype	1	15206	15205.6	3.14	0.079
Calving year	3	29823	9941.0	2.05	0.111
Calving season	3	738	246.0	0.05	0.985
Calving age	1	7807	7807.4	1.61	0.207
Farm nested in genotype	1	8	7.5	0.00	0.969
Error	116	562067	4845.4		
Total	125	624252			

Table 5: Least-squares means for calving interval.

Factors	n	CA (days)
	126	417.6±10.5
Genotype		
	Holstein	85 430.7±11.1
	Simmental	41 404.6±14.3
Calving year		
	2013	12 456.4±24.8
	2014	11 397.6±25.2
	2015	46 421.1±12.7
	2016	57 395.5±13.0
Calving season		
	Winter	33 417.5±12.4
	Spring	58 421.4±13.4
	Summer	19 418.7±21.2
	Fall	16 413.0±20.5
Calving age		
	Group I	51 428.1±15.8
	Group II	75 407.2±10.3
Farm nested in genotype		
	Farm A (Holstein)	58 431.1±17.3
	Farm C (Holstein)	27 430.2±14.5
	Farm B (Simmental)	41 404.6±14.3

Table 6: Economic analysis for the deviation of age at first calving from the ideal level (24 months) in terms of the calf loses.

AFC	n	Total loss (TL) (month)	Calf equivalent of loses CEL=TL / 12 (head)	Monetary equivalent of total calf losses METCL=CEL * 3960 (₺ [†])	Monetary equivalent of Average calf Loss per individual animal (₺ [†])
Farm A	58	186.79	15.56	61639.71	1062.75
Farm B	41	294.62	24.55	97224.60	2371.33
Farm C	27	210.69	17.56	69527.70	2575.10

[†]: 1 US Dollar corresponds to 5.341 Turkish Liras (Central Bank of Turkey, 01.02.2019).

Table 7: The economic analysis of Services per conception deviated from the ideal level (1 insemination)

SPC	n	Sum of differences from the ideal level (Insemination Number) IN	Total excess SPC spending TESS=IN*75 (₺ [†])	Av. excess SPC spending per animal (₺ [†])
Farm A	58	31	2325	40.09
Farm B	41	26	1950	47.56
Farm C	27	24	1800	66.67

[†]: 1 US Dollar corresponds to 5.341 Turkish Liras (Central Bank of Turkey, 01.02.2019).

Table 8: Economic analysis of Calving interval deviated from the ideal level (12 months) in terms of the calf loses.

CA	n	Total loss (TL) (Month)	Calf equivalent of loses (CEL=TL/12) (Head)	Monetary equivalent of total calf losses METCL=CEL*3.960 (₺ [†])	Monetary equivalent of Average calf Loss per individual animal (₺ [†])
Farm A	58	104.89	8.74	34601.16	596.57
Farm B	41	40.95	3.41	13513.83	329.61
Farm C	27	59.80	4.98	19734.99	730.93

[†]: 1 US Dollar corresponds to 5.341 Turkish Liras (Central Bank of Turkey, 01.02.2019).

The mean age at first calving of 126 animals was 897.5 days, and this value varied from 650.0 to 1840.0 days among farm operations. The age at first calving in Holsteins was just beyond the value of 751 – 764 days reported by Berry and Cromie (2009) in the same breed. Meanwhile the value determined in the current study was in the range (804 – 921 days) of different literatures (Akbaş and Türkmüt 1990, Kumuk et al. 1999, Galiç et al. 2005, Özkök and Uğur 2007, Tapkı et al. 2007, Tuna et al. 2007, Koçak et al. 2008, Bayrıl and Yılmaz 2010, Sariözkan et al. 2012). Kaygisiz and Elmaz (2008) was found a relatively higher value of 1260 days in Holsteins cows. The age at first calving detected in the Simmentals in the study was just above values of 893.6 and 861.9 days reported by Akbaş and Türkmüt (1990), Koçak et al. (2008) and Ulutas and Sezer (2009). Different feeding and management and origins of animals can be source of this variations.

The analysis of variance showed that the effect of the year of service on the SPC was significant ($p < 0.05$). The least-squares means of SPC and CI were 1.746, and 430.7 days for Holsteins and 1.471 and 404.6 days for Simmentals. Differences between genotypes in both traits were marginally significant ($p < 0.10$). Average service per conception founded for Holsteins was higher compared to some literature reports (Kumuk et al. 1999, Tapkı et al. 2007, Kaygisiz and Elmaz 2008, Bayrıl and Yılmaz 2010) but lower than that of Sariözkan et al. (2012). SPC determined for Simmentals was behind the values of 1.76 and 1.96 reported by Çilek and Tekin (2004) and Erdem et al. (2015) in Simmentals of Kazova Agricultural enterprise and Gökhöyük state farm in Turkey. These differences may have been caused by research conditions. The year of service was uniquely significant ($p < 0.05$) effect as an environmental factor for SPC. Çilek and Tekin (2004) reported similar results for this effect. Tapkı et al. (2007) reported that the effect of calving season was significant on SPC. Differences may have been due to the implementation of different models and climatic conditions. Meanwhile the data available may not be enough to detect the differences.

Average CI founded for Holsteins (430.7 days) was just above than the range (390.0 – 420.0 days) of some literature (Tapkı et al. 2007, Tuna et al. 2007, Kaygisiz and Elmaz, 2008, Berry and Cromie 2009, Bayrıl and Yılmaz, 2010, Sariözkan et al. 2012) While Kumuk et al. (1999) found that the calving intervals of cows in different public farms in Turkey were changed from 487 to 526.6 days. The finding of this study was well behind of them. CI for Simmentals (379.1 days) was just above the findings of Çilek and Tekin (2004) Erdem et al. (2015). The effects of environmental factors in this trait were found to be nonsignificant. But optimum calving interval in average farm operations must be up to 12 – 13 months for economic reasons (Uygur 2004). However, this cannot be fully achieved in practice. As a matter of fact, the value found in the current research is about a month and a half above the optimum. Considering this information, it may be mandatory for businesses to work hard on the reasons prolonging CI. Genetic and reproductive health problems and poor estrus detection must be taken into account by breeders.

Calf losses due to prolonged age at first calving in the farm operations were ranged from 15.56 to 24.55 heads. The excess costs of artificial insemination were calculated in each farm and it was changed from ₺40.08 (\$7.50) to ₺66.66 (\$12.48) per animal in farms. Total calf losses due to extended CI in each farm were 8.73, 3.41 and 4.98 heads, respectively. Total costs of calf losses calculated in terms of head on farm basis were ₺34,601.16 (\$6,478.40), ₺13,513.83 (\$2,530.21\$) and ₺19,734.99 (\$3,695), respectively. The calculated total costs were divided by the number of animals and resulting average calf losses per animal per farm operation were ₺596.57 (\$111.70), ₺329.60 (\$61.71) and ₺730.92 (\$136.85) respectively. Total calf losses due to age at first calving by farms were ₺61,639.71 (\$11,540.86), ₺97,224.60 (\$18,203.45) and ₺69,527.70 (\$13,017.73), respectively. The extra artificial insemination costs were ₺2325 (\$435.31), ₺1950 (\$365.10) and ₺1800 (\$337.01) in farms, respectively. The calculated total costs resulting from extended CI were divided by the number of animals and the resulting monetary values of average calf

losses per animal were ₺596.57 (\$111.70), ₺329.60 (\$61.71) and ₺730.92 (\$136.85) for each farm. In the lights of these findings, it is understood that the deviations from the ideal boundaries in terms of fertilization efficiency characteristics in different businesses of Afyonkarahisar can lead to significant money losses. Kumuk et al. (1999) reached similar

CONCLUSION

Holsteins and Simmentals reared in Afyonkarahisar conditions gave close values to the averages in Turkey in terms of fertility. It was determined that the fertility can be influenced by different environmental factors. ANOVA results showed that the differences between genotypes were in marginal significance ($p < 0.10$). The tendencies in least-squares means showed Simmentals gave more positive values than Holsteins. Given the total economic losses in farm operations, fertility traits and their importance must be considered in a professional manner. Otherwise, the extend of economic losses can reach to harmful levels for the business. The significant environmental factors and administrative measures must be thought carefully in selection programs to improve genetics of animals, and to prevent farm operations from economic losses.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was summarized from the first author's MSc. thesis. The authors are thankful to Afyonkarahisar Provincial Cattle Breeders' Association for the facilities provided.

Ethical Statement

This study is not subject to the permission of HADYEK in accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees".

Conflict of Interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Akbaş Y, and Türkmüt L.** Siyah Alaca. Simental ve Esmer sığırlarda akrabalı yetiştirme katsayısı ile bazı verim özellikleri arasındaki ilişkiler. 1. Döl Verim Özellikleri. Turkish J. Vet. Anim. Sci. 1990; 14: 247–255.
- Akbulut O, Tüzemen N, and Yanar M.** Erzurum şartlarında Siyah Alaca sığırların verimi 1. Döl ve süt verim özellikleri. Turkish J. Vet. Anim. Sci. 1992;16: 523–533.
- Ali MZ, Sultana S, Rahman M.T, Islam MS.** Economics of Fertility Management of Small Holding Dairy Farms in Banglades. Iran. J. Appl. Anim. Sci.2013; 3: 509–513.

results and stated that the main reasons for this phenomenon were the business administrations did not evaluate the importance of efficient fertility as well as the technical personnel not to pay attention to this issue and the related parameters not to be monitored adequately.

- Ata A.** Sütçü Sığırlarda Döl Verimi Ölçütlerinin Güncel Yorumu Current Assessments of Fertility Parameters in Dairy Cows. MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.2013;1(1):30-41.
- Ayvazoğlu D, Aydın E, Ayvazoğlu C.** Estimation of the economic losses related to calf mortalities kars province, in Turkey. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.2019; 25: 283–289. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.20471>
- Bayrı T, Yılmaz O.** Kazova Vasfı Diren Tarım İşletmesinde Yetiştirilen Siyah Alaca Sığırların Döl Verimi Özellikleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg. 2010; 21: 163–167.
- Berry DP, Cromie AR.** Associations between age at first calving and subsequent performance in Irish spring calving Holstein-Friesian dairy cows. Livest. Sci. 2009; 123: 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.10.005>
- Çilek S, Tekin E.** Environmental Factors Affecting Milk Yield and Fertility Traits of Simmental Cows Raised at the Kazova State Farm and Phenotypic Correlations between These Traits. Turkish Journal of Veterinary And Animal Sciences.2005; 29:987-993.
- Erdem H, Atasever S, Kul E.** Relations of body condition score with milk yield and reproduction traits in Simmental cows. Large Anim. Rev. 2015; 21: 231–234.
- Galiç A, Şekeroğlu H. and Kumlu S.** İzmir İli Siyah Alaca Irkı Sığır Yetiştiriciliğinde İlk Buzağılama Yaşı ve Süt Verimine Etkisi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 2005;18(1):87-93.
- Kaygisiz F, Elmaz Ö.** Süt Sığırcılığında Döl Verimi Kayıplarının İşletme Gelirine Etkisi. J Fac Vet Med Univ Erciyes. 2008; 5(1):5-10.
- Koçak, S, Tekerli M, Özbeyaz C, Demirhan İ.** Lalahan Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsün'de yetiştirilen Holştayn, Esmer ve Simental sığırlarda bazı verim özellikleri. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Derg. 2008; 48: 51–57.
- Kumuk T, Akbaş Y, Türkmüt L.** Süt Sığırcılığında Döl Verimine İlişkin Ekonomik Kıyılar ve Yetiştiricilerin Bilgi ve Teknoloji İhtiyacı. Hayvansal Üretim.1999; 39-40:1-12.
- Microsoft Excel.** 2016; <https://office.microsoft.com/excel>.
- Minitab 18.** 2017; <https://www.minitab.com/>.
- Mundan D, Karabulut O.** Sütçü sığırlarda damızlıkta kullanma süresi ve uzun ömürlülüğün ekonomik açıdan önemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.2008; 19: 65–68.
- Özkök H. and Uğur F.** Türkiye' de Yetiştirilen Esmer ve Siyah Alaca Sığırlarda Süt Verimi, İlk Buzağılama Yaşı ve Servis

Ray DE, Halbach T.J, Armstrong DV. Season and Lactation Number Effects on Milk Production and Reproduction of Dairy Cattle in Arizona. J. Dairy Sci. 1992; 75: 2976–2983. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78061-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78061-8)

Sarıözkan S, Aral Y, Murat H, Aydın E, Sarıözkan S. Kayseri İli süt sığırcılığı işletmelerinde fertilitite bozukluklarından kaynaklanan finansal kayıpların hesaplanması. Ankara Üniv Vet Fak Derg: 2012; 59, 55-60.

Silva HM, Wilcox CJ, Thatcher WW, Becker RB, Morse D. Factors Affecting Days Open, Gestation Length, and Calving Interval in Florida Dairy Cattle. J. Dairy Sci. 1992; 75, 288–293. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77764-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77764-9)

Tahtabıçen, E. Tekirdağ Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği'ne Kayıtlı Bazı İşletmelerde Süt Verim Özelliklerini Etkileyen Çevre Faktörlerinin Belirlenmesi. Unpublished Master Thesis. Namık Kemal Uni. 2008; Tekirdağ, Turkey.

Tapkı İ, Şahin M. and Okyay SM. Ceylanpınar Tarım İşletmesinde Yetiştirilen Siyah Alaca Sığırların Süt ve Döl Verim Özellikleri 1. Süt Verim Özellikleri. . MKU Ziraat Fakültesi Derg. 2007; 12: 1–8.

Tuna Y, Gürçan EK, Savaş T. Sarımsaklı Tarım İşletmesinde Yetiştirilen Siyah-Alaca Irkı Süt Sığırlarının Döl Verim Özellikleri, Journal of Tekirdag Agricultural Faculty. 2007; 4(3):347-357.

Ulutas Z, Sezer M. Genetic Study of Milk Production and Reproduction Traits of Local Born Simmental Cattle in Turkey Yerli Simmental Sığırlarının Süt ve Döl Verim Özelliklerine ait Genetik. GOU. Ziraat Fakültesi Derg. 2009; 26: 53–59.

Uygur AM. Süt sığırcılığı sürü yönetiminde döl verimi. Hayvansal Üretim 2004; 45: 23–27.

Wathes DC, Oguejiofor CF, Thomas C, Cheng Z. Importance of Viral Disease in Dairy Cow Fertility. Engineering. 2020; 6: 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2019.07.020>

Yılmaz A, Erkmen R, Kibar M. Economic Losses from Fertility Problems in Holstein Crossbreed Dairy Cows in a Commercial Dairy Farm. Selcuk J. Agric. Food Sci. 2018; 32: 81–86. <https://doi.org/10.15316/sjafs.2018.68>.

The Effects of TGF- β 3, 17- β Estradiol and Bisphenol A on Osteoprotegerin Production in Osteoblasts

Tayfun DİKMEN^{1*}

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Dept. of Histology and Embryology, 03200, Afyonkarabisar, Turkey

ABSTRACT

Bone metabolism is a complicated and challenging issue in both physiological and pathological states. The homeostasis of the tissue is majorly being managed by the competing activities of osteoblasts and osteoclasts. Osteoprotegerin (OPG) is a decoy receptor for RANKL and it inhibits osteoclast differentiation by binding RANKL and being produced primarily by osteoblasts. The decrease in OPG level causes excessive osteoclast activation which results in high bone resorption that overcomes new bone formation. Therefore, it is important to understand the mechanism of OPG production and identify its regulators. In this study, it was aimed to address the effects of TGF- β 3, 17- β estradiol and bisphenol A (BPA), an endocrine disrupter, on OPG production from osteoblasts. For this purpose, hfOB cells were treated with TGF- β 3, 17- β estradiol and BPA for 48 hours both alone and in combinations. The effects of these agents were evaluated by sandwich-ELISA. The analysis showed that TGF- β 3 and 17- β estradiol treatment causes an increase in OPG levels when used in combination. It was also discovered that BPA exhibits antagonistic effect on OPG production when used along with TGF- β 3 and 17- β estradiol.

Keywords: 17- β Estradiol, Bisphenol A, Osteoprotegerin, TGF- β 3.

TGF- β 3, 17- β Estradiol ve Bisphenol A'nın Osteoblastlar Üzerinde Osteoprotegerin Üretimine Etkileri

ÖZ

Kemik metabolizması hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda karmaşık ve zorlu bir konudur. Dokunun homeostazisi büyük oranda osteoblastların ve osteoklastların karşılıklı aktiviteleri ile idare edilmektedir. Osteoprotegerin (OPG), başlıca osteoblastlar tarafından üretilen ve RANKL ile bağlanarak osteoklast farklılaşmasının inhibe edilmesini sağlayan bir tuzak reseptördür. OPG seviyesindeki düşüş yoğun osteoklast aktivasyonuna ve dolayısı ile yeni kemik yapımını aşan miktarda kemik yıkımına sebep olmaktadır. Bu nedenle OPG üretim mekanizmasını anlamak ve OPG'nin düzenleyicilerini tanımlamak önem arz etmektedir. Bu çalışmada TGF- β 3, 17- β estradiol ve bir endokrin bozucu olan bisfenol A'nın (BPA) osteoblastlardan OPG üretimine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla hfOB hücrelerine TGF- β 3, 17- β estradiol ve BPA 48 saat boyunca tek başlarına ve kombinasyon halinde uygulandı. Bu faktörlerin etkileri sandviç ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Yapılan analizde TGF- β 3 ve 17- β estradiolün kombinasyon halinde kullanımının OPG seviyelerinde artış sağladığı belirlendi. Ayrıca, çalışmada BPA'nın OPG üretimi üzerine antagonistik etkilerini TGF- β 3 ve 17- β estradiol ile birlikte uygulandığında gösterdiği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: 17- β Estradiol, Bisfenol A, Osteoprotegerin, TGF- β 3.

To cite this article: Dikmen T. The Effects of TGF- β 3, 17- β Estradiol and Bisphenol A on Osteoprotegerin Production in Osteoblasts. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):217-224

Submission: 01.03.2021 Accepted: 06.04.2021 Published Online: 04.05.2021

ORCID ID; TD: 0000-0003-4470-7465

*Corresponding author e-mail: tayfundikmen@hotmail.com.tr

INTRODUCTION

Bone is a complex tissue which comprises both organic and inorganic compounds. Thus, the phenomenon of bone homeostasis is matching with the complexity of the tissue itself as many influencing factors such as hormones, growth factors, vitamins, minerals and various other proteins get involved with the process (Bouillon and Suda 2014, Rodan 1998). Osteoblasts and osteoclasts stand as two frontiers for the homeostasis of the tissue as they are chief responsible for bone remodeling events. The homeostasis process heavily depends on the equilibrium between the actions of these two cell types. Osteoblasts are responsible for new bone formation, while osteoclasts oppose this action by resorbing the bone tissue and by these battling events, the renewal of the adult skeleton goes on throughout the entire lifetime of an individual (Langdahl et al. 2016).

Osteoblasts are specialized cells which are producing severely important bone-specific proteins such as osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein, osteoprotegerin (OPG), osteonectin, etc. and originate from the undifferentiated mesenchymal stem cells of bone marrow (Katagiri and Takahashi 2002, Schoppet et al. 2002). On the other hand, osteoclasts are multinucleated bone resorbing cells and their precursors are of monocyte/macrophage family that located within bone marrow (Udagawa et al. 1990). The osteoclastogenesis has a complex stimulation system as there are multiple factors both trying to enhance and inhibit the differentiation at the same time. The main actors of osteoclast differentiation are RANK, RANKL and OPG proteins which interact with each other and regulate osteoclastogenesis in bone. The osteoclast precursor cells have a specific surface receptor called RANK which binds with a tumor necrosis factor (TNF) superfamily protein called RANKL to induce osteoclast differentiation (Lam et al. 2001). The RANKL is being secreted by many cell types including osteoblasts and lymphoid tissue cells; but the protein is primarily produced by B and T-lymphocytes and the production of RANKL by these cells reported to be up regulated in some bone tissue disorders (Chaparro et al. 2020, Kawai et al. 2006, Yeo et al. 2011). However, OPG; a TNF receptor superfamily protein which is a soluble decoy receptor secreted by osteoblasts, binds with RANKL and blocks RANK/RANKL complex formation for inhibiting osteoclast differentiation (Dougall 2010, Simonet et al. 1997, Tong et al. 2019). There is a matter of balance in RANKL/OPG ratio in normal physiology but in certain situations like osteoporosis, the balance is disturbed in favor of RANKL and massive amounts of bone loss occurs as the OPG levels decrease (McClung 2007). Along with osteoporosis, OPG is also thought to has a significant role in bone regeneration, especially in cases of bone

fractures (Köttstorfer et al. 2014). TGF- β superfamily proteins and steroid hormones are known to have a great importance in pathways related with bone tissue. Alongside with their numerous roles, estradiol and TGF- β superfamily proteins also act as positive influencers for OPG production (Murakami et al. 1998, Thirunavukkarasu et al. 2001, Zuo et al. 2020). Although, TGF- β 1 of the TGF superfamily was studied for its effect on OPG, TGF- β 3 remains relatively understudied.

Bisphenol A (BPA) (2,2-bis (hydroxyphenyl) propane), is a widely used plasticizer and a known endocrine disrupter which counteracts estrogens by binding to estrogen receptors especially α & β (Diel et al. 2000, Vitku-Kubatova et al. 2018). BPA is reported to have negative effects on many organs and tissue types including brain (Özden Akkaya et al. 2018), skeletal muscle (Jing et al. 2019) and bone (Thent et al. 2018). BPA is also shown to have inhibitory effects on expressions of bone related markers *in vitro*. It has been reported that 24 hours of BPA exposure cause a decrease in the expressions of RANK, RUNX2 and Osterix along with decreased ALP activity (Hwang et al. 2013). Alongside with these findings, BPA causes lower actin density in cytoskeletal structures of osteoblasts and also significantly down regulates some of the important osteoblast proliferation and differentiation markers (Thent et al. 2020). Although, BPA is known to disturb bone metabolism, its effects on OPG production are still undetermined.

In this study, it was aimed to demonstrate the effects of TGF- β 3 17- β estradiol and BPA on OPG production from osteoblasts both alone and in certain combinations *in vitro*.

MATERIALS and METHODS

Cell Culture

Human fetal osteoblastic cells (hfOB) (ATCC 1.19 CRL-11372, passage 7) were cultured in DMEM/F12 (with 15 mM HEPES) (Biowest, France) with 1% penicillin-streptomycin (10.000 U/mL) (Gibco, UK), 10% fetal bovine serum (Biowest, South America Origin), 200 mM L-glutamin (Gibco, UK) at 37°C in 5% CO₂ environment. The culture medium was changed every three day intervals. Cells were trypsinized (0.25 % trypsin and 0.01% EDTA) (Capricorn, Germany) at 70-80% confluence and passaged.

Cell Culture Treatments

hfOB cells were seeded in normal hfOB growth medium at a density of 1x10⁶ cells / flask in 75 cm² culture flasks after passaging. After 24 hours, culture medium was replaced with the desired culture media respective to the experimental groups. The design of the experimental groups are given in table 1. A control group was set using standard hfOB growth medium. In the first experimental group, the hfOB

medium was supplemented with 10 ng / mL TGF- β 3 (Peprotech, USA). In the second group, cells were cultured with 10 nM 17- β estradiol (BioGems, USA) in hfOB medium. The culture media for the third group consisted of hfOB medium supplemented with 10 ng / mL TGF- β 3 and 10 nM 17- β estradiol together. Then, in the fourth group, 12.5 μ g/mL bisphenol A (Sigma-Aldrich, USA) was added to the hfOB medium and finally, for the fifth group, 12.5

μ g/mL bisphenol A was added into 10 ng/mL TGF- β 3 and 10 nM 17- β estradiol supplemented hfOB medium. Cells were incubated at standard conditions for 48 hours. After 48 hours, the supernatant was collected into centrifuge tubes. The collected samples were centrifuged at 1000 g for 10 minutes to avoid cellular debris. After filtering the supernatant using 0.22 μ PES syringe filters, samples were stored at -80°C until further use.

Tablo 1. Deneý grupları ve kùltür medyumunda yapılan uygulamalar.

Table 1. Experimental groups and respective treatments in culture mediums.

Groups	Treatments
Control Group	hfOB growth medium
Group 1	10 ng/mL TGF- β 3 supplemented medium
Group 2	10 nM 17- β Estradiol supplemented medium
Group 3	10 ng/mL TGF- β 3 + 10 nM 17- β Estradio supplemented medium
Group 4	12.5 μ g/mL BPA supplemented supplemented medium
Group 5	10 ng/mL TGF- β 3 + 10 nM 17- β Estradiol + 12.5 μ g/mL BPA supplemented supplemented medium

Sandwich ELISA

The measurement of OPG levels in cell culture supernatant samples were determined by using a commercial ELISA kit (Abcam, ab100617) as per instructions of the manufacturer. The sensitivity of the assay was 1 pg / mL and the range was 1.23 pg / ml to 900 pg / mL. Standard solutions were run in duplicates while the samples were run in triplicates. Six samples were used for each group and the absorbance was measured at 450 nm. The standard curve and the sample measurements were made using CurveExpert 1.3 software.

Statistics

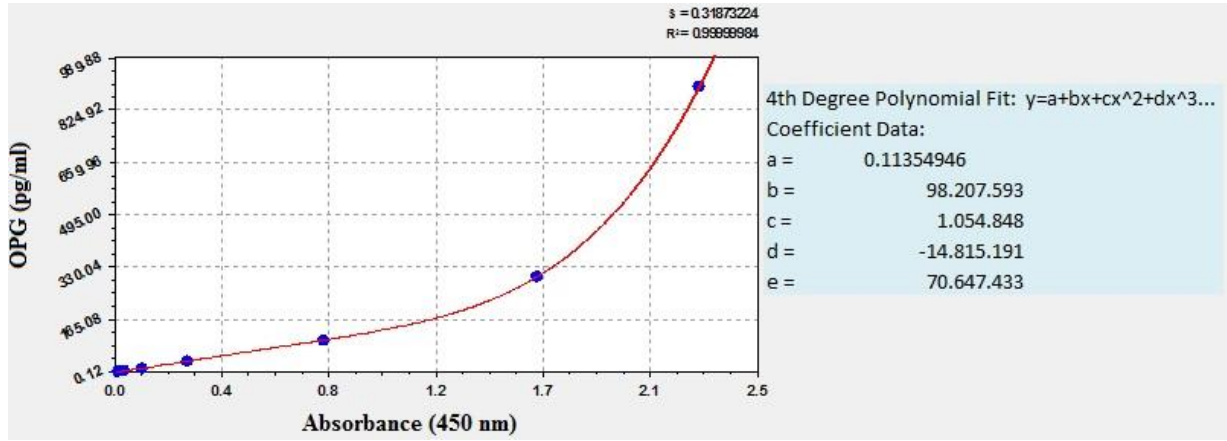
The data was analyzed for outliers using Tukey's Fence Test and the normal distribution of the samples were examined with Shapiro-Wilk Test. As there were no outliers found and the data was found to be normally distributed, One-Way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test was used to assess the data. All statistical analysis were performed with SPSS v20 (IBM) and the graphs were made using GraphPad Prism 8 software.

RESULTS

For all experimental groups, no visible changes in the morphology of cells were observed during culture. The OPG level measurements of the groups were determined according to a 4th degree polynomial fit standard curve ($R^2=0,99999984$) (Fig. 1). The

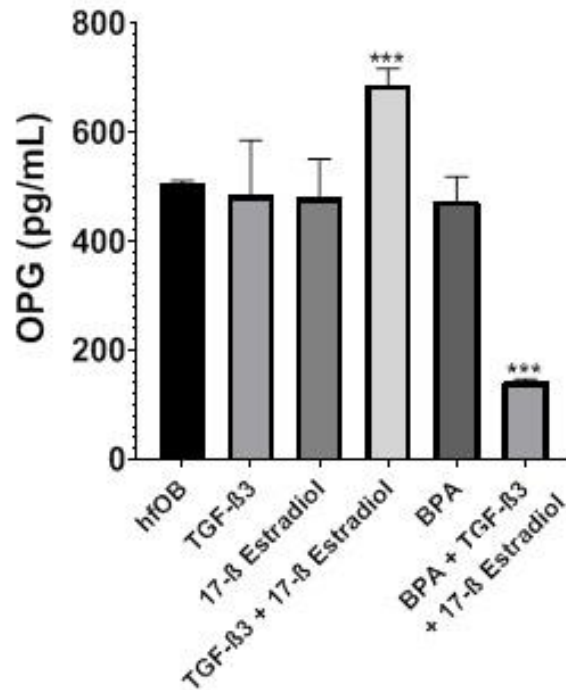
calculated data were assessed statistically by using One-Way ANOVA (Summary given in Table 2) and the groups were compared with each other using Tukey's Multiple Comparisons Test (Table 3). The OPG levels in control group were found to be approximately 507 ($\pm 2,07$) pg/mL in standard culture conditions. Statistical analysis showed that there were no significant changes in the OPG levels for TGF- β 3 or 17- β estradiol treated samples when compared to the control samples (p : 0,986 and 0,966) as the OPG levels were measured as 485 ($\pm 41,1$) pg/mL and 480 ($\pm 28,9$) pg/ml respectively. However, the combination of TGF- β 3 and 17- β estradiol resulted with the highest OPG levels in culture samples as much as 687 ($\pm 12,3$) pg/mL concentration which was significantly higher ($p < 0,001$) when compared to the control group and all other experimental groups (Table 2; Figure 2).

BPA, on the other hand was found to have no significant effects on OPG secretion when supplemented into normal growth medium alone (p : 0,926). The average concentration of OPG was found to be 474 ($\pm 17,9$) pg /mL in BPA treatment group. However; when BPA was used in combination with TGF- β 3 and 17- β estradiol, the OPG levels decreased drastically as only 143 ($\pm 1,68$) pg /mL OPG was measured which was significantly lower when compared to the control ($p < 0,001$) and all other experimental groups (Table 2; Figure 2).



Şekil 1: 4. derece polinomial fit standart eğrisi ve denklemini ($R^2=0,99999984$).

Figure 1: 4th degree polynomial fit standard curve and it's equation ($R^2=0,99999984$).



Şekil 2: Deneş gruplarında OPG seviyeleri. TGF-β3 ve estradiol ilave edilmiş grup en yüksek OPG salgılayan grup olarak belirlenirken aynı gruba BPA ilavesi en düşük OPG seviyesiyle sonuçlandı. Diğer gruplar arasında belirgin bir fark gözlenmedi.

Figure 2: OPG levels among experimental groups. TGF-β3 and Estradiol supplemented group observed as the highest OPG releasing group while BPA supplementation in the same group showed the lowest OPG levels. There were no significant difference was visible between other groups.

Tablo 2. One-Way ANOVA test özeti.

Table 2. Summary of One-Way ANOVA test.

ANOVA summary	
F	59,89
P value	<0,001
P value summary	***
Significant diff. among means	Yes
R square	0,9117

Table 3. Deneý gruplarında OPG seviyeleri Tukey's Multiple Comparisons Test ile karşılaştırıldı (***: p<0,001).
Table 3. Comparison of OPG levels among experimental groups were assessed with Tukey's Multiple Comparisons Test (***: p<0,001).

Compared Groups	Significancy	p value
hfOB vs. TGF- β 3	Ns	0,986
hfOB vs. Estradiol	Ns	0,966
hfOB vs. TGF- β 3+Estradiol	***	<0,001
hfOB vs. BPA	Ns	0,926
hfOB vs. BPA+TGF- β 3+Estradiol	***	<0,001
TGF- β 3 vs. Estradiol	Ns	>,999
TGF- β 3 vs. TGF- β 3+Estradiol	***	<0,001
TGF- β 3 vs. BPA	Ns	>,999
TGF- β 3 vs. BPA+TGF- β 3+Estradiol	***	<0,001
Estradiol vs. TGF + Est	***	<0,001
Estradiol vs. BPA	Ns	>0,999
Estradiol vs. BPA+TGF- β 3+Estradiol	***	<0,001
TGF- β 3+Estradiol vs. BPA	***	<0,001
TGF- β 3+Estradiol vs. BPA+TGF- β 3+Estradiol	***	<0,001
BPA vs. BPA+TGF- β 3+Estradiol	***	<0,001

DISCUSSION

In the study it was aimed to investigate the effects of TGF- β 3, 17- β estradiol and BPA on OPG production from osteoblasts both alone and in various combinations *in vitro*. The reduced amounts of OPG production in certain bone degenerative diseases like osteoporosis and a search for better bone regeneration in cases like bone fractures prompted scientists to understand the secretion mechanism of OPG to utilize it as a tool against osteoclastic activity. Therefore, many scientists attempted to identify positive and negative regulators of OPG. Along with a variety of proteins like interleukin 1 α , bone morphogenic protein 2, TNF α , etc.; especially estrogen and TGF- β had been identified as important positive regulators of OPG (Hofbauer et al. 1999, Hofbauer et al. 1998, Murakami et al. 1998). In the case of TGF- β superfamily, although there are some reports indicating the effects of TGF- β 1 (Murakami et al. 1998), the effect of TGF- β 3 on OPG levels had not been investigated individually. As TGF- β 1 and β 3 target same pathways and share similar actions on osteogenesis (Grafe et al. 2018), a similarity is thought to be possible in the context of OPG production as well.

The doses and concentrations of TGF- β 3 and 17- β estradiol were determined from their known effective dose for osteogenic differentiation of cells (Hong et al. 2006, Karbanodva et al. 2010). While, the dose of BPA was decided upon a previous study on hfOB cells which IC₅₀ value of BPA was reported as 12.5 μ g/mL (Thent et al. 2020).

The results of the study indicate that both 17- β estradiol and TGF- β 3 did not improve OPG levels in hfOB samples after 48 hours of culture when they supplemented alone. However, a combination of both, resulted in increased levels of OPG. The results of the studies conducted by Hofbauer et al. (1999) and Saika et al. (2001) demonstrate that estrogen successfully stimulates the OPG expression in human osteoblasts and mouse stromal cells, alone. In contrast with the findings of these reports, no individual up regulation was seen in OPG levels when 17- β estradiol was used alone. The cell line hfOB, had been shown to express both 46 kDa and 77 kDa isoforms of estrogen receptor (ER) α in western blot analysis in previous studies (Foo et al. 2007). However, both Hofbauer et al. (1999) and Saika et al. (2001) further transfected their cells with ER α gene. Therefore, the results of the recent study may indicate that hfOB cells do not contain sufficient amounts of ER α to be further stimulated by estradiol.

hfOB cells are osteoblastic cells which spontaneously differentiates into mature osteoblasts in culture conditions as they showed increasing levels of osteogenic markers in normal culture conditions and share some similarities with bone marrow mesenchymal stem cells as they express some mesenchymal markers in early stages (Yen et al. 2007). Wang et al. (2006) verified that the ER α expression is being increased during the process of osteogenic differentiation. Thent et al. (2020) also reported positive expressions for all estrogen receptors; ER α , ER β and estrogen related receptor

gamma, in hfOB cells after using a 6 day differentiation protocol.

TGF- β 3 is known to have a key role in early osteoblast differentiation and RUNX2 expression which is essential for osteoblast differentiation as well (Grafe et al. 2018). In this study, supplementation of TGF- β 3 may induce maturation of hfOB cells and increase the expression of ER α during this process. That probability may explain the increased levels of OPG when TGF- β 3 and 17- β estradiol used in a combination, since it is known that ER α transfected hfOB reported to have increased OPG mRNA levels by the stimulation of 17- β estradiol alone (Hofbauer et al. 1999). The synergetic effects of TGF- β 3 and 17- β estradiol in the context of OPG production may be explained by the increased levels of ER α under the influence of TGF- β 3 which causes 17- β estradiol to be more effective.

The BPA experiments also support this view as there was no effect seen on OPG levels when BPA was used alone but a significant decrease was visible when it was supplemented with TGF- β 3 and 17- β estradiol. Routledge et al. (2000), reported that BPA has lower binding affinity to estrogen receptors α and β compared to 17- β estradiol. Hiroi et al. (1999) also reported that BPA has lower affinity to estrogen receptors but despite this much lower affinity, they reported that BPA can compete around half of the estrogenic activity in same concentration. Hiroi et al. (1999) also investigated the effects of BPA and 17- β estradiol together and they discovered that BPA is having antagonistic effects only when it binds with ER α in the presence of 17- β estradiol.

The recent study suggests that it is possible for TGF- β 3 to cause an increase in ER α levels on hfOB cells by inducing their maturation and as a result 17- β estradiol and BPA have a chance to reveal their effects on OPG production through ER α . To back this view, an experiment group should be established containing a combined supplementation of BPA and TGF- β 3 and ER α levels should be examined throughout the study by comparing the measurements between all experimental groups in future studies.

CONCLUSIONS

The study indicates that TGF- β 3 and 17- β estradiol have an enhancing effect on OPG secretion from osteoblasts and this effect may be correlated with ER α levels of the cells which should be further investigated. Although, it was known that BPA had various effects on bone metabolism, its effects on OPG was demonstrated for the first time. But in order to identify how this action was induced by BPA, further research is needed especially by demonstrating whether its effect is through ER α and if there is any correlation with the expression levels of the receptor.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express his deep gratitude to Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ and Asst. Prof. Dr. Özlem ÖZDEN AKKAYA for reviewing the manuscript.

Ethical Statement: This study is not subject to the permission of HADYEK in accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees".

Conflict of Interest: Author declares no conflict of interest for this manuscript.

REFERENCES

- Bouillon R, Suda T.** Vitamin D: calcium and bone homeostasis during evolution. *Bonekey Rep.* Nature Publishing Group; 2014;3(January): 1–10. <http://dx.doi.org/10.1038/bonekey.2013.214>
- Chaparro A, Sanz A, Wolnitzky A, Realini O, Bendek MJ, Betancur D, Albers D, Beltrán V.** Lymphocyte b and th17 chemotactic cytokine levels in peri-implant crevicular fluid of patients with healthy, peri-mucositis, and peri-implantitis implants. *J. Oral Res.* 2020;2020(Special Issue 1): 20–5.
- Diel P, Schulz T, Smolnikar K, Strunck E, Vollmer G, Michna H.** Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: Estrogenicity profiles and uterotrophic activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2000;73(1–2): 1–10.
- Dougall WC.** Mechanistic role of RANKL in cancer-induced bone diseases and development of a targeted therapy to inhibit this pathway. First edit. *Bone Cancer.* Elsevier Inc.; 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374895-9.00032-3>
- Foo C, Frey S, Yang HH, Zellweger R, Filgueira L.** Downregulation of β -catenin and transdifferentiation of human osteoblasts to adipocytes under estrogen deficiency. *Gynecol. Endocrinol.* 2007;23(9): 535–40.
- Grafe I, Alexander S, Peterson JR, Snider TN, Levi B, Lee B, Mishina Y.** TGF- β Family Signaling in Mesenchymal Differentiation. Cold Spring Harb. *Perspect. Biol.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2018;10(5): a022202. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28507020>
- Hiroi H, Tsutsumi O, Momoeda M, Takai Y, Osuga Y, Taketani Y.** Differential Interactions of Bisphenol A and 17 β -estradiol with Estrogen Receptor α ; (ER α) and ER β ; *Endocr. J.* 1999;46(6): 773–8.
- Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S.** Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;250(3): 776–81.

- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL.** Estrogen Stimulates Gene Expression and Protein Production of Osteoprotegerin in Human Osteoblastic Cells*. *Endocrinology* 1999;140(9): 4367–70. <https://doi.org/10.1210/endo.140.9.7131>
- Hong LIU, Colpan A, Peptan IA.** Differentiations of Human Mesenchymal Stem Cells. 2006;12(10).
- Hwang JK, Min KH, Choi KH, Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY, Chang JS.** Bisphenol A reduces differentiation and stimulates apoptosis of osteoclasts and osteoblasts. *Life Sci. Elsevier Inc.*; 2013;93(9–11): 367–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.07.020>
- Jing J, Pu Y, Gingrich J, Veiga-Lopez A.** Gestational Exposure to Bisphenol A and Bisphenol S Leads to Fetal Skeletal Muscle Hypertrophy Independent of Sex. *Toxicol. Sci.* 2019;172(2): 292–302.
- Karbanodvá J, Soukup T, Suchánek J, Mokry J.** Osteogenic differentiation of human dental pulp-derived stem cells under various ex-vivo culture conditions. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2010;53(2): 79–84.
- Katagiri T, Takahashi N.** Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 2002;8(3): 147–59.
- Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CWO, Izumi Y, Taubman MA.** B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am. J. Pathol. American Society for Investigative Pathology*; 2006;169(3): 987–98. <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2006.060180>
- Köttstorfer J, Thomas A, Gregori M, Kecht M, Kaiser G, Eipeldauer S, Sarahrudi K.** Are OPG and RANKL involved in human fracture healing? *J. Orthop. Res.* 2014;32(12): 1557–61.
- Lam J, Teitelbaum SL, Fremont DH, Lam J, Nelson CA, Ross FP, Teitelbaum SL, Fremont DH.** Crystal structure of the TRANCE / RANKL cytokine reveals determinants of receptor- ligand specificity Find the latest version : Crystal structure of the Online first publication TRANCE / RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. 2001;108(7): 971–9.
- Langdahl B, Ferrari S, Dempster DW.** Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2016;8(6): 225–35.
- McClung M.** Role of RANKL inhibition in osteoporosis. *Arthritis Res. Ther.* 2007;9(SUPPL.1): 1–6.
- Murakami T, Yamamoto M, Yamamoto M, Ono K, Nishikawa M, Nagata N, Motoyoshi K, Akatsu T.** Transforming growth factor- β 1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;252(3): 747–52.
- Özden Akkaya Ö, Yağcı A, Tosun M, Altunbaş K.** Föetal ve Neonatal Rat Beyin Dokusunda Bisphenol A'nın Notch Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi. *Uludağ Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.* 2018;37(2): 109–17.
- Rodan GA.** Commentary Bone homeostasis. *Commentary.* 1998;95(November): 13361–2.
- Routledge EJ, White R, Parker MG, Sumpter JP.** Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) α and ER β . *J. Biol. Chem.* 2000;275(46): 35986–93.
- Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T.** 17 β -Estradiol Stimulates Expression of Osteoprotegerin by a Mouse Stromal Cell Line, ST-2, via Estrogen Receptor- α *. *Endocrinology* 2001;142(6): 2205–12. <https://doi.org/10.1210/endo.142.6.8220>
- Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC.** RANK ligand and osteoprotegerin: Paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002;22(4): 549–53.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trall G, Sullivan J, ... Boyle WJ.** Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89(2): 309–19.
- Thent ZC, Froemming GRA, Muid S.** Bisphenol A exposure disturbs the bone metabolism: An evolving interest towards an old culprit. *Life Sci. Elsevier Inc.* 2018;198(2017): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.02.013>
- Thent ZC, Ruth Anisah Froemming G, Binti Mohd Ismail A, Baharom Syed Ahmad Fuad S, Muid S.** Phytoestrogens by inhibiting the non-classical oestrogen receptor, overcome the adverse effect of bisphenol A on hFOB 1.19 cells. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2020;23(9): 1155–63.
- Thirunavukkarasu K, Miles RR, Halladay DL, Yang X, Galvin RJS, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE.** Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor- β (TGF- β). Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF- β effects. *J. Biol. Chem.* 2001;276(39): 36241–50.
- Tong X, Gu J, Song R, Wang D, Sun Z, Sui C, Zhang C, Liu X, Bian J, Liu Z.** Osteoprotegerin inhibit osteoclast differentiation and bone resorption by enhancing autophagy via AMPK/mTOR/p70S6K signaling pathway in vitro. *J. Cell. Biochem.* 2019;120(2): 1630–42.
- Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T.** Origin of osteoclasts: Mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990;87(18): 7260–4.
- Vitku-Kubatova J, Kolatorova L, Franekova L, Blahos J, Simkova M, Duskova M, Skodova T, Starka L.** Endocrine disruptors of the bisphenol and paraben families and bone metabolism. *Physiol. Res.* 2018;67: S455–64.

- Wang Q, Yu J hua, Zhai H hong, Zhao Q tao, Chen J wu, Shu L, Li D qiang, Liu D yong, dong C, Ding Y.** Temporal expression of estrogen receptor alpha in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;347(1): 117–23.
- Yen M, Chien C-C, Chiu I, Huang H-I, Chen Y-C, Hu H-I, Yen BL.** Multilineage Differentiation and Characterization of the Human Fetal Osteoblastic 1.19 Cell Line: A Possible In Vitro Model of Human Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells.* 2007;25(1): 125–31.
- Yeo L, Toellner KM, Salmon M, Filer A, Buckley CD, Raza K, Scheel-Toellner D.** Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2011;70(11): 2022–8.
- Zuo HL, Xin H, Yan XN, Huang J, Zhang YP, Du H.** 17 β -Estradiol improves osteoblastic cell function through the Sirt1/NF- κ B/MMP-8 pathway. *Climacteric.* 2020;23(4): 404–9.

Prevalence of *Toxocara vitulorum* in Calves in Afyonkarahisar, Turkey

Esma KOZAN¹, Fatih Mehmet BİRDANE², Mahmut Sinan EREZ^{3*}, Ahmet GÖKSÜ⁴

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Parasitology, 03200 Afyonkarahisar, Turkey

²Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Internal Medicine, 03200 Afyonkarahisar, Turkey

³Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Parasitology, 03200 Afyonkarahisar, Turkey

⁴Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Parasitology, 03200 Afyonkarahisar, Turkey

ABSTRACT

This study was conducted to determine the prevalence of *Toxocara vitulorum* in calves in Afyonkarahisar between March 2018 and April 2019. Faecal samples from 603 calves in 22 different villages of Afyonkarahisar province of Turkey were randomly collected and examined for the presence of *T. vitulorum* eggs using the Fülleborn saturated saltwater flotation method. A total of five of 603 calves (0.83%) were found to be infected with *T. vitulorum*. All of the faeces infected with *T. vitulorum* belonged to animals between 0-6 months of age. The prevalence of the infection in males was 0.97% and 0.68% in females. There was no statistically significant difference in the prevalence of *Toxocara vitulorum* by either breed or gender ($P > 0.05$).

Keywords: Afyonkarahisar, Calf, *Toxocara vitulorum*

Afyonkarahisar Yöresi Buzağlarında *Toxocara vitulorum* Yaygınlığının Belirlenmesi

ÖZ

Bu çalışma Mart 2018-Nisan 2019 tarihleri arasında Afyonkarahisar ilinde yetiştirilen buzağlarda *T. vitulorum* yaygınlığını tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Afyonkarahisar'da sığır yetiştiriciliği yapılan ve rastgele seçilen 22 farklı köyden, değişik ırk, yaş ve cinsiyette toplam 603 hayvana ait dışkı örnekleri Fülleborn Doymuş Tuzlu Su Flotasyon yöntemi ile *T. vitulorum* yumurtalarının varlığı açısından incelenmiştir. Dışkı muayenesi yapılan 603 hayvanın beşinin (%0.83) dışkısında *T. vitulorum* yumurtaları görülmüştür. *Toxocara vitulorum* yönünden pozitif bulunan dışkıların tamamının 0-6 aylık hayvanlara ait olduğu tespit edilmiştir. Erkeklerde hastalığın yaygınlığı %0.97 dişilerde ise %0.68 olarak belirlenmiştir. *Toxocara vitulorum*'un yaygınlığında ırk ve cinsiyetler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($P > 0.05$).

Anahtar kelimeler: Afyonkarahisar, Buzağı, *Toxocara vitulorum*

To cite this article: Kozan E, Birdane F.M, Erez M.S, Göksü A. Prevalence of *Toxocara vitulorum* in Calves in Afyonkarahisar, Turkey.

Kocatepe Vet J. (2021) 14(2):225-230

Submission: 09.01.2021 Accepted: 17.04.2021 Published Online: 05.05.2021

ORCID ID; E.K: 0000-0001-9473-6198 FMB: 0000-0003-0026-800X MSE: 0000-0001-7407-7383 AG: 0000-0001-6040-761X

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

INTRODUCTION

Cattle, which are bred in almost every part of the world except for polar regions, provide approximately 86.3-89.5% of world milk production and 25% of meat production alone. The physical power of cattle was taken advantage of throughout human history, and cattle skin, nail, horn and manure were used for various purposes (Akman et al. 2019). Afyonkarahisar is one of the provinces where cattle breeding is common in Turkey.

Besides bacterial and viral diseases that cause significant economic losses in cattle, parasitic diseases can also lead to decreased meat, milk quality, fertility and even death. The existence of parasitic diseases, which reduce healthy, high quality and productive breeding, varies depending on regional and climatic differences, farm management, animal husbandry and feeding conditions (Morgan et al. 2006).

Toxocara vitulorum (Goeze 1782), first recorded in 1782, is a parasite of calves. Adults usually settle in the small intestine of cattle, buffalo and zebu which are younger than six months of age and are rarely identified in animals older than six months of age (Euzeby 1963). Adult females who feed on intestinal contents shed their eggs with a brown-black, oval-round, thick shell and rough surface into faeces. Infective larvae develop inside the *T. vitulorum* eggs within less than three weeks in the presence of appropriate temperature, humidity and oxygen (Euzeby 1963; Güralp 1981). An adult female *T. vitulorum* can produce thousands of eggs every day. The eggs per gram of faeces of an infected calf could be between 8000-100.000 (Roberts 1989).

The life cycle of *T. vitulorum* varies according to the age and sex of the animals. The source of infection for animals younger than six months old is usually inhibited larvae in the mother's tissues. These larvae gain activity in the late stages of pregnancy and some will cause prenatal infection in the offspring transplacentally, while the remaining larvae migrate to the breast tissue and continue to infect the offspring through colostrum and milk (Soulsby 1986; Toparlak and Tüzer 1997).

Eggs are detected 16-23 days after birth in the faeces of infected calves. While the disease is most common in 1-3-month-old calves, it is rarely seen in animals older than 6 months old (Güralp 1981; Akyol 1993). After the 38th day of life, calves begin to excrete adult parasites in the faeces, and most calves have cleared the infection by six months of age (Soulsby 1986).

Clinical signs appear 10-15 days after birth and are observable for six months (Urquhart et al. 1996). Clinical signs relate to digestive disorder, anorexia, greasy, foul-smelling diarrhoea or constipation and

dehydration occur due to damage to the intestinal mucosa in infected animals. In addition to these, pyrexia, neurological signs, anaemia, a tangled and dull appearance in the haircoat, a cough, other respiratory signs and a butyric acid smell (like garlic) on the breath are clinical signs that can be seen. Due to severe infections, death can occur linked to peritonitis as a result of intestinal perforation (Urquhart et al. 1996; Devi et al. 2000).

Toxocara vitulorum adults, which have a strong pathogenic effect in calves up to six months old, cause the formation of ulcerative areas in the small intestines, obstruction, torsion and perforation of the intestines (Toparlak and Tüzer 1997; Arslan et al. 1997). Due to larvae migrating through the body of the host, focal necrosis in the liver and lung and inflammation in regional lymph nodes and eosinophilia can develop (Roberts 1993).

Previous studies have shown that prevalence of *T. vitulorum* varies between 0.3-29% in different provinces of Turkey (Güralp et al. 1985; Toparlak et al. 1989; Umur and Gıcık 1995; Toparlak et al. 1996; Aydenizöz et al. 1999; Altınöz et al. 2000; Aydın et al. 2006; Arslan et al. 2008, Avcioğlu and Balkaya 2011). To our knowledge, this is the first report of *T. vitulorum* in calves in Afyonkarahisar, Turkey. This study aimed to investigate the prevalence of *T. vitulorum* in family cattle farms in Afyonkarahisar province and intended to contribute to the understanding of the parasite fauna of Turkey.

MATERIALS and METHODS

This study was carried out using 603 cattle of different age, breed and genders from different villages in Afyonkarahisar between March 2018 and April 2019. The distribution of the faecal samples according to age, gender, breed and province of the animals are given in Table 1.

Between March 2018 and April 2019, 22 villages were visited and faecal samples were taken directly from the rectum of a total of 603 animals that were bred in the family farms and had not received any anthelmintics and were grazing most of the time. Breed, age, gender and study regions of animals were recorded. Faecal samples were brought to the Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University in the cold chain and the samples that could not be examined parasitologically on the same day were stored at 4 °C until they were examined. Samples were examined parasitologically with Fulleborn saturated saline method. Eggs per gram (EPG) was quantitatively determined for positive samples using the McMaster technique.

Table 1. The distribution of animals according to age, gender, breed and province.

Province	Age		Gender		Breed		
	0-6 month	6-12 month	Female	Male	Simmental	Holstein	Brown Swiss
Bolvadin	82	39	51	70	39	37	45
Çay	49	43	48	44	34	28	30
Centrum	65	45	58	52	60	27	23
İhsaniye	54	41	41	54	39	41	15
Şuhut	46	48	50	44	38	36	20
Sandıklı	52	39	45	46	39	37	15
Total	348	255	294	309	284	226	93

RESULTS and DISCUSSION

Toxocara vitulorum egg was detected in five (0.83%) of the examined faecal samples of 603 animals. All of the samples identified as positive for *T. vitulorum* belonged to 0-6-month-old animals. Three samples (0.97%) were from male animals (one 2-month-old, two 1-month-old) and two samples (0.68%) were from female animals (one 1-month-old, one 2-month-

old). *Toxocara vitulorum* eggs were not observed in animals older than six months of age. There was no statistically significant difference between male and female animals in terms of prevalence of *T. vitulorum* eggs, and also no significant difference was determined between breeds ($P>0.05$). The number of EPG was calculated as minimum 7,500 EPG and maximum 35,500 EPG. The distribution of infection by study regions, breed, age and gender are given in Table 2.

Table 2. Distribution of infection by study region, breed, age and gender

	Number of Examined Cattle	Number of Infected Cattle	Infection Rate %
Study Region			
Bolvadin	121		
Çay	92		
Centrum	110		
İhsaniye	95		
Şuhut	94	1	1.06
Sandıklı	91	4	4.40
Gender			
Female	294	2	0.68
Male	309	3	0.97
Age			
0-6 months	348	5	1.44
6-12 months	255		
Breed			
Simmental	284	2	1.06
Holstein	226	1	0.44
Swiss Brown	93	1	1.07

Toxocara vitulorum, which is common in tropical and subtropical climates, is a parasite that causes a disease with high morbidity and mortality, especially in calves less than three months old, and causes significant economic losses. (Srivastava and Sharma 1981; Güralp et al. 1985; Akyol 1993).

The prevalence of *T. vitulorum* varies by country; 2.94% in Syria (El-Moukdad 1979), 15.2% in India (Gupta et al. 1985), 54.4% in Nigeria (Rekwot and Ogunsusi 1985), 40% in China (Wen et al. 1986), 9% in North Central Florida (Davila et al. 2010), 37.5% in Pakistan (Raza et al. 2013) and 12.4% in Cambodia (Dorny et al. 2015). Few studies have determined the prevalence of *T. vitulorum* in Turkey; 4.6% in Ankara (Güralp et al. 1985), 2.2% in Bursa (Akyol 1993), 4.3% in Thrace (Toparlak et al. 1996), 0.3-6.2% in Konya (Aydenizöz et al. 1999; Altınöz et al. 2000), 16% in Van (Toparlak et al. 1989), 7.5% in Kars (Umur and Gıcık 1995), 28.96% in Hakkari (Aydın et al. 2006) and 1.1-22.2% in Erzurum (Arslan et al. 2008; Avcıoğlu and Balkaya 2011). Güralp et al.

(1985) reported that 0.8% of the calf faecal samples collected from different regions of Turkey were infected with *T. vitulorum* eggs. In this study, *T. vitulorum* eggs were detected in five of the examined faecal samples of 603 cattle and the prevalence of the *T. vitulorum* infection was determined to be 0.83% in Afyonkarahisar. Infection rate of *T. vitulorum* in Afyonkarahisar is similar to other studies in Turkey, despite having a lower infection rate than a few studies. It has been observed that cattle are going the field for grazing in Şuhut and Sandıklı districts, while in other regions they are generally kept in barns throughout the year. In the districts of Şuhut and Sandıklı, it was determined that the use of anthelmintics was less than other regions as a result of talking with animal owners. It is thought that these differences may be caused by the difference in anthelmintics usage and housing conditions.

Inactive larvae in the muscles of infected pregnant animals gain activity in the last period of pregnancy and pass to offspring as trans-placentally and via milk, for up to one month in the postpartum period. Host

resistance begins to develop from 6-months-old with the advancement of age, and larvae gradually become inhibited in muscle tissue (Güralp 1981; Soulsby 1986; Umur et al. 2006). Studies have reported that *T. vitulorum* is more common in 1-3-month-old calves that its incidence decreases gradually until one year of age, and is very rare after this time (Akyol 1993; Umur and Gıcık 1995; Arslan 1997; Aydın et al. 2006; Avcıoğlu and Balkaya 2011, Dorny et al. 2015). In this study, *T. vitulorum* eggs were observed in the faeces of five of 348 calves aged 0-6 months and the prevalence in this age group was determined to be 1.44%. These results agree with current understanding of the disease pattern and prevalence, suggesting that Afyonkarahisar has similar levels of infection to other regions of Turkey.

Although some researchers (Güralp, 1985; Toparlak et al. 1989) report that the infection is more common in males than females, others report that the disease has no relationship with sex (Akyol 1991; Roberts 1993; Altınöz et al. 2000). This study determined that two (0.68%) of 294 female calves and three (0.97%) of 309 male calves are infected with *T. vitulorum*, and the difference was not statistically significant between males and females ($P > 0.05$).

It is reported that the number of EPG in faeces of infected animals with *T. vitulorum* is related to the egg production capacity of female parasites and that therefore the EPG does not correlate with the severity of infection (Soulsby 1986; Roberts 1993). Previous studies have reported EPG ranging between 25 and 95,200 EPG in faeces of infected animals in Turkey (Güralp et al. 1985; Toparlak et al. 1989; Akyol 1993; Umur and Gıcık 1995; Aydın et al. 2006; Avcıoğlu and Balkaya 2011). In this study, the number of EPG ranged from 7,500 to 35,500 EPG in the faeces of infected animals. These values remained within the range reported in previous studies.

CONCLUSION

Toxocara vitulorum was detected in 1-2-month-old calves in different villages of Afyonkarahisar. Although the prevalence of the infection was low compared to some other studies, it should be taken into consideration that disease in this age group carries high morbidity and mortality in calves. It was concluded that the farmers should be informed about the disease and appropriate treatment options. Importantly, prevention and control measures should be discussed and implemented with local veterinarians.

Ethical Statement: This study is not subject to the permission of HADYEK in accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees".

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

Financial support: This study was supported by the Scientific Research Projects Coordination Unit of Afyon Kocatepe University with project number 17.KARİYER.176.

REFERENCES

- Akman N, Özkütük K, Kumlu S, Yener SM (2019). Türkiye'de sığır yetiştiriciliği ve sığır yetiştiriciliğinin geleceği. http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/71c50ad1a156d72_ek.pdf?üpi=14&sube=erişim tarihi: 23.10.2019.
- Akyol ÇV. Bursa yöresi sığırlarında *Toxocara (Neosascaris) vitulorum*'un epidemiyolojisi. Doktora tezi. Uludağ Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 1991.
- Akyol ÇV. Epidemiology of *Toxocara vitulorum* in cattle around Bursa, Turkey. J Helminthol. 1993; 67(1): 73-77.
- Altınöz F, Gökçen A, Uslu U. Konya yöresi sığırlarında *Toxocara vitulorum*'un yayılışı. Türkiye Parazit Derg. 2000; 24(4): 405-407.
- Arslan MÖ, Umur Ş, Özcan K. Buzağlarda ölümcül *Toxocara vitulorum* olgusu. Türkiye Parazit Derg. 1997; 21(1): 79-81.
- Arslan MÖ, Sarı B, Taşçı GT, Aktaş MS. Erzurum yöresinde buzağlarda *Toxocara vitulorum* yayınlığı. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2008; 14(1): 37-40.
- Avcıoğlu H and Balkaya I. Prevalence of *Toxocara vitulorum* in calves in Erzurum, Turkey. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2011; 17(3): 345-347.
- Aydenizöz M., Aldemir, O. S., Güçlü, F. Dışkı muayenesiyle sığırlarda tesbit edilen parazitler ve yayılışları. T Parazit Dergisi. 1999; 23(1): 83-88.
- Aydın A, Goz Y, Yüksek N, Ayaz E. Prevalence of *Toxocara vitulorum* in Hakkari eastern region of Turkey. Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy. 2006; 50(1): 51.
- Davila G, Irsik M, Greiner EC. *Toxocara vitulorum* in beef calves in North Central Florida. Veterinary Parasitology, 2010; 168(3-4): 261-263.
- Devi HU, Ansari MZ, Singh SK, Devi KB. Prevalence and epidemiology of *Toxocara vitulorum* in cow and buffalo calve in and around Ranchi, Bihar. Indian Journal of Animal Sciences (India). 2000; 70(8): 817-819.
- Dorny P, Devleeschauwer B, Stoliaroff V, Sothy M, Chea R, Chea B, Sourloing H, Samuth S, Kong S, Nguong K, Sorn S, Holl D, Vercruyse J. Prevalence and Associated Risk Factors of *Toxocara vitulorum* Infections in Buffalo and Cattle Calves in Three Provinces of Central Cambodia. The Korean Journal of Parasitology. 2015; 53(2): 197-200.
- El-Moukdad AR. Helminth fauna of Syrian cattle. Angew Parasitology. 1979; 20(1): 11-16.
- Euzeby J. Les Maladies Vermineuses des Animaux Domestiques et Leurs Incidences sur la Pathologie Humaine. Vigot Freres. 1963; (1,2): 478-626.
- Gupta RP, Yadav CL, Ghosh JD. Epidemiology of helminth infections in calves of Hayrana state. Agricultural Science Digest. 1985; (5): 33-56.
- Güralp N. Helminoloji 2. Baskı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi. Yayın No. 368 Ankara Üniv Basımevi Ankara, 1981; pp. 426.
- Güralp N, Tınar R, Doğanay A, Çoşkun ŞZ. Türkiye sığırlarında *Toxocara vitulorum*'un yayılışı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 1985; 41(2): 20-26.

- Morgan ER, Torgerson PR, Shaikenov BS, Usenbayev AE, Moore ABM, Medley GF, Milner-Gulland EJ.** Agricultural restructuring and gastrointestinal parasitism in domestic ruminants on the rangelands of Kazakhstan. *Veterinary Parasitology*. 2006; 139 (1-3): 180-191.
- Raza MA, Murtaza S, Ayaz MM, Akhtar S, Arshad HM, Basit A, Bachya HA, Ali M, Khan MI.** *Toxocara vitulorum* infestation and associated risk factors in cattle and buffalo at Multan District, Pakistan. *Science International (Lahore)*. 2013; 25(2): 291-294.
- Roberts JA.** The extraparasitic life cycle of *Toxocara vitulorum* in the village environment of Sri Lanka. *Veterinary Research Communications*. 1989; 13(5): 377-388.
- Roberts JA.** *Toxocara vitulorum* in ruminants. *Helminthological Abstracts*. 1993; 62(4): 151-174.
- Rekwot PJ, Ogunsusi RA.** Prevalence of *Toxocara (Neoscaris) vitulorum* infection in cattle around Zaria, Nigeria. *Journal of Animal Production Research*. 1985; 5(2): 201-207.
- Srivastava AK, Sharma DN.** Studies on the occurrence, clinical features and pathomorphological aspects of ascariasis in buffalo calves. *Veterinary Research Journal*. 1981; 4(2): 160-162.
- Soulsby EJJL.** Helminths, Artropods and Protozoa in Domesticated Animals, 7th Edition, Ed; Bailliere Tindall, William Cloves Limited, London, England. 1986; pp. 142-158.
- Toparlak M, Değer S, Yılmaz H.** Van yöresi sığırlarında *Toxocara (Neoscaris) vitulorum* enfeksiyonunun yayılışı. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 1989; 36(2): 404-412.
- Toparlak M, Arslan MÖ, Gargılı A, Tüzer E.** Prevalence of *Toxocarosis vitulorum* in cattle in Thracia, Turkey. *Doğa Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi*. 1996; (20): 341-342.
- Toparlak M, Tüzer E.** Veteriner Helmintoloji Ders Notları, İstanbul, 1997; pp. 102.
- Umur Ş, Gıcık Y.** Kars yöresi sığırlarında *Toxocara vitulorum*'un yayılışı. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 1995; 42(1): 25-29.
- Umur Ş, Köroğlu E, Güçlü F, Tınar R.** Nematoda. In: *Helmintoloji*, Ed: Tınar R. Nobel Yayın Dağıtım, Nobel Basımevi, Ankara. 2006; pp. 381-382.
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW.** *Veterinary Parasitology*. Ed: Urquhart GM, 2nd Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1996; pp. 270.
- Wen YL, Zhvang ZL, Lin BM, Pan YD, Gao BZ, Wang TJ.** An epidemiologic survey of *Neoscaris* in calves, China. *Chinese Veterinary Science and Technology*. 1986; 8(1): 18-20.

Investigation of Heavy Metal Residues in Heat-Treated Drinking Milk Offered for Sale in the Market

Zeynep Azat CIDIROĞLU¹, Ali AYDIN^{1*}

¹*İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 34320 Avcılar, İstanbul, Turkey*

ABSTRACT

Milk that is necessary at every period of human life, is a good source for macro and micro food elements besides C vitamin and iron. However, most of milk and milk products may contaminate to heavy metal instruments and equipment that is used in production during lactation period. The aim of this study was to detect of presence of lead, cadmium, mercury, arsenic in heat treated drinking offered for sale in the market. A total 100 UHT (n= 90) and pasteurized milk (n= 10) samples was taken from different markets in İstanbul, in 2011. Milk samples had been burnt with the method of Mars 5 microwave closed system wet burning in the laboratory. Then the presence of lead, cadmium, mercury and arsenic was analysed by ICP-OES apparatus. According to the results, 34 samples and 36 samples of the 100 heat treated milk were not detected in lead and cadmium, respectively. However, mercury and arsenic heavy metals were not found in any of the samples. Drinking milk samples contain lead above the maximum residue limit and presence cadmium was considered important for public health.

Keywords: Heat-treated milk, heavy metals, residue, ICP-OES

Piyasada Satışa Sunulan Isı İşlemi Görmüş İçme Sütlerinde Ağır Metal Kalıntılarının Araştırılması

ÖZ

İnsan yaşamının her evresinde gerekli olan süt, C vitamini ve demir dışında makro ve mikro besin öğeleri için iyi bir kaynaktır. Bununla birlikte süt ve süt ürünlerinin pek çoğu laktasyon periyodu esnasında ve üretimde kullanılan alet ve ekipmanlar nedeniyle ağır metal kontaminasyonuna maruz kalabilmektedir. Bu çalışma, çoğunlukla marketlerden alarak tüketilen ısı işlemi görmüş içme sütlerinde kurşun, kadmiyum, civa, arsenik ağır metallerinin olup olmadığını araştırmak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla 2011 yılında İstanbul ili içerisinde bulunan çeşitli marketlerden değişik markalardaki 100 adet UHT (n: 90) ve pastörize (n: 10) süt numunesi temin edilmiştir. Süt numuneleri laboratuvara getirilerek Mars-5 mikrodalga kapalı sistem yaş yakma yöntemiyle yakılmıştır. Daha sonra ICP-OES cihazı ile kurşun, kadmiyum, civa, arsenik kalıntıları yönünden analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda 100 adet ısı işlemi görmüş süt numunelerinin 34 adedi ve 36 adedinde sırasıyla kurşun ve kadmiyum tespit edilememiştir. Bununla birlikte, numunelerin hiçbirinde civa ve arsenik saptanamamıştır. İçme sütü örneklerinin maksimum kalıntı sınırının üzerinde kurşun içermesi ve kadmiyum tespiti, halk sağlığı açısından önemli olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Isı işlemi görmüş süt, ağır metaller, kalıntı, ICP-OES

To cite this article: Cıdıröğlü Z.A. Aydın A. Investigation of Heavy Metal Residues in Heat-Treated Drinking Milk Offered for Sale in the Market.

Kocatepe Vet J. (2021) 14(2): 231-237

Submission: 16.02.2021 **Accepted:** 19.04.2021 **Published Online:** 06.05.2021

ORCID ID; ZAC: 0000-0003-3259-8986 AA: 0000-0002-4931-9843

*Corresponding author e-mail: aliaydin@istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Süt doğumdan itibaren insanların severek tükettiği bir gıda olup, insan metabolizmasında pek çok yararının olduğu bilinmektedir (Özel 2008). Süt, beslenme değerinin yüksekliği yanında beyine enerji sağlamakta ve sinir sistemi gelişimini desteklemektedir. İlave olarak, sütün bağırsak florasını düzenleyerek sindirimi düzenlediği de bilinmektedir. Özellikle, büyüme ve gelişme çağındaki çocukların süt ve süt ürünlerini tüketmesi ilerleyen yaşlarda ortaya çıkması muhtemel osteoporoz hastalığından korunmada büyük önem taşımaktadır (Ünal ve Besler 2008). Türkiye’de süt üretimi hedeflenen ve beklenen düzeyde olup, üretilen süt miktarının 2019 yılında 13.749.349 ton ve 2020 yılında 14.180.943 ton olduğu bildirilmektedir (Anonim 2021). Buna ilave olarak, 2019 yılında kişi başı içme sütü tüketiminin 39,7 kg olduğu bildirilmektedir (Anonim 2019).

Çiğ süt kolayca bozulan değerli bir hammadde olmakla birlikte, süt endüstrisi tarafından temel adım olarak benimsenen ısı işlemleri uygulanarak raf ömrünün uzatılması mümkündür (Stulova ve ark. 2011). İlave olarak, uygulanan ısı işlemi ile patojen ve bozulma yapan mikroorganizma sayısının azaltılması, çiğ sütte bulunan enzimlerin etkisiz hale getirilmesi ve kimyasal reaksiyonlar ile fiziksel değişiklikler en aza indirilmektedir (Aydın ve Vural 2020). Çiğ süte ısı işlemi sonucunda hem ürünün raf ömrü uzamakta, hem de uygulanan ısı işlemine bağlı olarak sütün besin değerini minimum düzeyde kaybetmesi sağlanmaktadır (Ritota ve ark. 2017). Sütün değişik süt ürünleri şeklinde tüketimi mümkün olsa da çoğunlukla içme sütü olarak kullanımı söz konusudur. Nitekim, ülkemizde içme sütünün %92’si UHT süt, geri kalanı ise pastörize süt olarak satışa sunulmaktadır (Aydın ve Vural 2020).

Toprak, su ve havada endüstrileşmenin bir sonucu olarak, konsantrasyonu artan ağır metal ve metalik bileşikler, gıda zinciri sayesinde insan ve hayvanları kontamine ederek sağlık üzerinde olumsuz etki oluşturmaktadır (Kılıç ve Bozkaya 2017). Süt ve süt mamullerinde ağır metal bulaşması; sütün elde edildiği hayvan ile hava, su veya yem kaynaklı olabileceği gibi depolama ve üretim esnasında süt ve ürünlerinin içine konulduğu makineler ve ekipmanlar, gıdaların ambalajları ile kaplarından da kaynaklanabilmektedir (Temurci ve Güner 2006; Yılmaz Aksu ve Sandıkçı Altunatmaz 2017).

Kurşun (Pb), doğada en çok bulunan ağır metal olup, kullanılmakta olan en eski metallere biri olarak bilinmektedir. Pb havaya bileşik veya yalın halde karıştığı için ve her durumda toksik ve çevre kirliliğine neden olan en önemli ağır metal olarak rapor edilmektedir (Kahvecioğlu ve ark. 2004). Diğer bir ağır metal olan Kadmiyum (Cd) ağır metaller içinde, suda çözünme özelliği en yüksek olan elementtir. Doğada hızlı yayılıp yeraltı suları ve toprağa bulaşmak suretiyle, bitkilerle gıda zincirine dâhil olmaktadır (Yılmaz Aksu ve Sandıkçı Altunatmaz 2017). Doğaya

çeşitli kaynaklardan salınan civa (Hg) atmosfer, su ve topraktaki dönüşümler ve özellikle sularındaki mikro ve makroorganizmaların etkisiyle en tehlikeli formu olan metil civaya dönüşmektedir. Civalı bileşikler açısından en riskli gıda grubu arasında, balık ve su ürünleri ilk sıralarda yer almaktadır (Yılmaz Aksu ve Sandıkçı Altunatmaz 2017). Arsenik (As), yeryüzünde her zaman bulunabilen, küresel sağlık riski faktörü olarak düşünülen bir metalloiddir. As doğada organik ve inorganik formlarda bulunmaktadır (İlhak 2015). Gıda maddeleri içerisinde organik arseniğe öncelikle balık, istiridye, karides, midye gibi deniz ürünlerinin tüketimi ile maruz kalınırken; inorganik arsenik ile ise gıda, su, hava ve mesleki olarak temas edilmektedir. Gıda maddeleri içerisinde, süt ve süt ürünleri genelde düşük düzeyde ağır metal içermekte ise de, söz konusu ağır metal ihtiva eden süt ve süt ürünlerinin sürekli tüketimi sonucu vücutta akümülyasyona bağlı zararlı etkiler meydana gelmektedir (Sancak ve ark. 2019).

Günümüzde gıdalarda ağır metal kalıntılarının tespiti için birçok metot kullanılmakla birlikte genellikle, Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS), Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) ya da Inductively Coupled Plasma-Optic Emission Spectrometry (ICP-OES) yöntemlerinin kullanımı tercih edilmektedir (Cıdıroğlu ve Aydın 2020).

Bu çalışmada, ısı işlemi görmüş içme sütlerinde (Pastörize Süt, UHT Yağlı Süt, UHT Yarım Yağlı Süt, UHT Aromalı Süt, UHT Yağsız Süt) Pb, Cd, As ve Hg varlığının ICP-OES yöntemi kullanılarak tespiti amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Süt Örneklerinin Temini

Araştırma kapsamında 2011 yılında İstanbul ili içerisinde bulunan çeşitli marketlerden toplam 100 adet süt örneği temin edilmiştir. Kullanılan süt örnekleri pastörize (n: 10), UHT yağlı (n: 25), UHT yarım yağlı (n: 20), UHT yağsız (n: 20) ve UHT aromalı (n: 25) olmak üzere rastgele biçimde karışık satın alınarak en kısa sürede analiz laboratuvarına ulaştırılmıştır.

Süt Örneklerinin Analize Hazırlanması

Süt numunelerinin temini sonrası, laboratuvarında ambalajlarının açılması sonrası teflon tüplere konulmuş ve 0,0001 g hassasiyetteki terazide 0,3-1 g arasında tartılmıştır. Tüplerin içerisine, çeker ocak içerisinde 10 ml nitrik asit (MERCK 100456, Almanya), tüplerin üst kısmına gelmeyecek şekilde, dikkatlice ilave edilmiş ve yaklaşık 10 dakika nitrik asidin numuneyi eritip buhar çıkışının sağlanması beklenmiştir. Reaksiyon gerçekleşikten sonra teflon tüpler kapatılıp, kapağın uç kısmındaki membranlar kontrol edilmiştir. Yakma cihazı içerisine ilk olarak kontrol kabı konulup, basınç ve sıcaklık sensörleri takılmış ve sensörlerin konumları kontrol edilmiştir.

Daha sonra teflon tüpler Mars 5 mikrodalga yaş yakma sistemine (MARS 240-50, CEM Corp., ABD) yerleştirilmiş ve uygun metot seçilerek yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yakma işlemi sonrası, teflon tüplerde bulunan numuneler % 1'lik nitrik asit ile yıkanarak falkon tüpüne aktarılmak suretiyle gerekli hacme tamamlanarak cihazda analize hazır hale getirilmiştir (Anonim 1998).

Süt Örneklerinin Analizi

Hazırlanan numunelerin Pb, Cd, Hg ve As varlığını tespit etmek için ICP-OES (VARIAN 710-ES, USA) cihazı kullanılmıştır. Örneklerin analizi sonrası, otomatik olarak yapılan okuma işlemi sonuçları (mg/kg olarak), cihazın bağlı olduğu içerisinde spesifik bir program bulunan bilgisayara kaydedilmiştir (Çelik 2017).

Pb tespiti için kullanılacak standartlar % 1'lik nitrik asit ile hazırlanmıştır. Standartlar 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg ile 25 mg/kg'lık hacimler şeklinde ayarlanmıştır. ICP-OES cihazında argon gazı yardımıyla uygulanacak metot, bilgisayar ortamında oluşturulmuştur. Plasma yakımını takiben kalibrasyon eğrisi çizdirilerek numunelerin okuması gerçekleştirilmiştir (Anonim 2018).

Cd tespiti için, Pb analizine benzer şekilde %1'lik nitrik asitle standartlar hazırlanarak metot oluşturulmuş ve kalibrasyon eğrisi çizdirilerek numunelerin okuması gerçekleştirilmiştir (Anonim 2018).

Hg için, Pb ve Cd elementlerinden ayrı olarak hidrür sistemi devreye sokularak standartlar (2,5 mg/kg, 5mg/kg, 10 mg/kg ile 25 mg/kg) hazırlanmıştır. Söz konusu sistemde numune indirgeyici olarak redüktant ve asit kullanılmıştır. Çözümler 5M HCl (MERCK 1.00317, Almanya) ve belirlenen konsantrasyonlardaki redüktant kullanılarak hazırlandıktan sonra, cihaza konularak ikinci gaz vanasının açılması suretiyle kalibrasyon eğrisi çizdirilmiş ve numunelerin okuması gerçekleştirilmiştir.

As ağır metali analizleri de civa da olduğu gibi hidrür sistemle birlikte cihaz kullanım kılavuzu doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Anonim 2004).

İstatistik Analizler

Verilerin analizi için ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler ile frekans ve tanımlayıcı istatistikler kullanılmıştır. Ayrıca farklı süt çeşitlerinin Pb ve Cd içerikleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek için non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testinden yararlanılmıştır. Süt çeşitleri arasındaki anlamlı ilişkiyi belirlemek için, diğer bir non-parametrik test olan Mann-Whitney testi de kullanılmıştır. Söz konusu testler, Windows için SPSS sürüm 22.0'da gerçekleştirilmiş olup, bu testler için, $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Ağır metallerin çeşitli yollar ile gıda zincirine bulaşan en zararlı toksik kimyasallar olması, gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından ağır metalleri önemli bir bulaşan haline getirmektedir (Yılmaz Aksu ve Sandıkçı Altunatmaz 2017). Özellikle sanayinin yoğun olduğu bölgelerde atmosfere karışan ağır metaller, yağmur ve kar yardımıyla su kaynağı, toprak, bitki ve gıda zinciri yoluyla hayvan ve insanlara ulaşmaktadır (İlhak 2015). Çevresel kirlenme sonucu ağır metaller ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesiyle birçok toksik etki meydana gelmektedir. Bu bakımdan, süt ve süt ürünlerinin güvenliği, toksik bileşenlerin artan konsantrasyonları ve çevresel kirlenmelerin özellikle de ağır metal mevcudiyetinde giderek azalmaktadır (Sancak ve ark. 2019). Özellikle ağır metal içeren suları tüketen ya da ağır metal ile kontamine bitkilerle beslenen hayvanların dokuları ve sütleri aracılığıyla ağır metaller gıda zincirine dahil olarak insanlara bulaşmaktadır (Bayrakal ve Aydın 2019). Çevresel kontaminasyonlar sonucu sütte bulunan ağır metaller olarak Pb, Cd, Hg ve As ilk sıralarda yer almakta ve sütlerin tüketilmesiyle birçok toksik etki meydana gelmektedir (Bayrakal ve Aydın 2019; İlhak 2015; Kılıç Altun ve ark. 2019). Diğer taraftan, ağır metal kalıntıları süte, sağılan hayvanın yem ve suyundan bulaşması yanında, havadan doğrudan geçebileceği gibi sütün taşındığı veya depolandığı kaplardan da dolaylı olarak bulaşabilmektedir (İstanbuluoğlu ve ark. 2013). İlave olarak, süt ve peynir gibi asidik nitelikli gıdaların üretiminde kullanılan kapların bileşimindeki metallerin çözünerek ürüne geçme riskinin diğer besinlere göre daha kolay olduğu bildirilmektedir (Temurci Usta ve Güner 2006).

Türkiye'deki sütlerde ağır metal kontaminasyonunun tespiti, halk sağlığı açısından büyük önem taşımakta olup konu ile ilgili bilimsel birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan bir kısmı incelendiğinde; Bursa ilinde (Simsek ve ark. 2000), Çanakkale ilinde (Bıgucu ve ark. 2016), Ankara ilinde (İstanbuluoğlu ve ark. 2013; Temurci Usta ve Güner 2006), Afyon ilinde (Kan ve Küçük Kurt 2018), Konya ilinde (Ayar ve ark. 2007), Samsun ilinde (Temiz ve Soylu 2000), İzmir ilinde (Gövercin 2010), Denizli ilinde (Kılıç ve Bozkaya 2017) ve Aydın ilinde (İnci ve ark. 2017) araştırmacılar, süt ve ürünlerinde çeşitli düzeylerde Pb, Cd, As, Hg, Al, Cr, Co, Cu, Fe, Ni, Mn, ve Se gibi metallerin varlığı bildirilmiştir.

Süt ve süt ürünlerinin üretim aşamalarında uygulanan teknolojik işlemler, Pb ve Cd gibi bazı ağır metallerin konsantrasyonunda önemli artışa neden olabilmektedir (Sancak ve ark. 2019). Çalışmada; incelenen süt örneklerinin 66 (%66) adedinde Pb tespit edilmiş olup; 59 adet süt örneğinde maksimum kalıntı limit değerinin (0,02 mg/kg) üzerinde, 7 örnekte ise tespit limiti ile maksimum kalıntı limiti arasında ($>0-0,02$ mg/kg) Pb belirlenmiştir. En yüksek Pb düzeyi 1,51 mg/kg olup aromalı sütte saptanmıştır (Tablo 1).

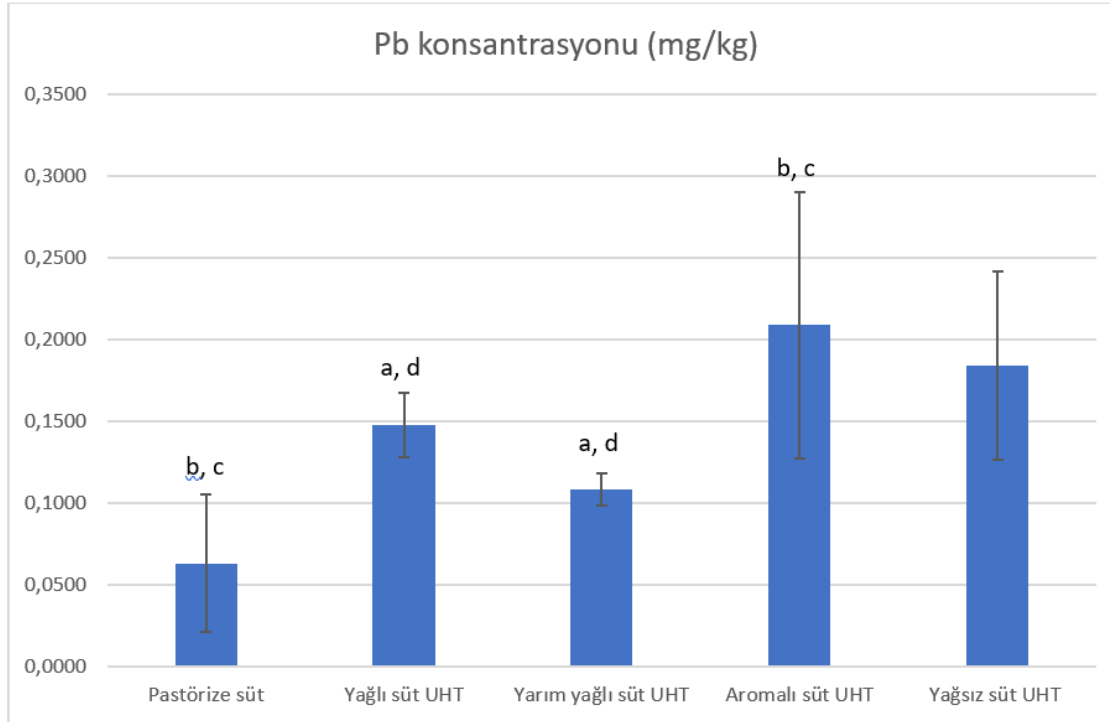
Table 1. Lead levels in the milk samples

Tablo 1. Süt numunelerindeki kurşun düzeyleri

Örnek Sayısı (n: 100)	Isı işleme görmüş süt numunelerinde Pb düzeyleri (%)					Toplam
	Pastörize Süt (n:10) (%)	Yağlı UHT Süt (n:25) (%)	Yarım Yağlı UHT Süt (n: 20) (%)	Yağsız UHT Süt (n:20) (%)	Aromalı UHT Süt (n:25) (%)	
Tespit edilemedi	8 adet (%80)	3 adet (%12)	1 adet (%5)	11 adet (%65)	18 adet (%72)	34 adet (%34)
>0 – 0,02* µg/kg	0 adet (%0)	4 adet (%16)	3 adet (%15)	0 adet (%0)	0 adet (%0)	7 adet (%7)
> 0.02 – 0,32 µg/kg	2 adet (%20)	18 adet (%72)	16 adet (%80)	9 adet (%35)	7 adet (%28)	59 adet (%59)
Total x-Sx*	0.0630 ±0.0420	0.1477 ±0.0197	0.1082 ±0.0101	0.1838 ±0.0515	0.2088±0.0815	100 (%100)

*AB ve Türk Gıda Kodeksi' (2008)ne göre kurşun Maksimum Kalıntı Limiti

*Lead Maximum Residue Limit according to the EU and Turkish food Codex Regulations



Şekil 1. Isı işleme görmüş sütler arasındaki Pb konsantrasyonlarının karşılaştırılması ($P < 0.05$). (a) Pastörize Süt, (b) UHT Yağlı Süt, (c) UHT Yarım Yağlı Süt, (d) UHT Aromalı Süt, (e) UHT Yağsız Süt. Pb konsantrasyonu sonuçları ortalama değerler alınarak bağımsız üç ölçümün \pm standart sapmaları ile birlikte kaydedilmiştir. Farklı harflere sahip ortalama değerler önemli ölçüde farklılık göstermektedir ($P < 0.05$).

Figure 1. Comparison of Pb concentrations between heat treated milk ($P < 0.05$). (a) Pasteurized Milk, (b) UHT Whole Milk, (c) UHT Semi-Skimmed Milk, (d) UHT Flavored milk (e) UHT Skim Milk. The results of the Pb concentrations were recorded together with the \pm standard deviations of three independent measurements, taking the mean values. Average values with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

Buna göre yapılan Normallik testinde farklı süt tiplerinde Pb miktarının normal dağılım göstermediği tespit edilmiştir. Bu nedenle, veriler için en uygun test olan Kruskal-Wallis Test uygulanmıştır. Kruskal-Wallis testine göre 5 farklı süt çeşidinin Pb içerikleri karşılaştırılmış ve Pb içeriklerine göre 5 farklı süt çeşidi için istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı oldukları saptanmıştır ($P<0.05$) (Şekil 1). Diğer taraftan, istatistiksel açıdan Pb değerinin hangi süt çeşitleri arasında anlamlı farklılıkta olduğunu tespit etmek amacıyla ikili gruplar halinde Mann-Whitney Testi uygulanmıştır. Uygulanan Mann-Whitney Testi sonucunda, Pastörize Süt ile UHT Yağlı Süt ve Pastörize Süt ile UHT Yarım Yağlı Süt arasındaki Pb düzeyi farklılığının istatistiksel açıdan anlamlı olduğu saptanmıştır ($P<0.05$). Benzer şekilde, UHT Yağlı Süt ile UHT Aromalı Süt Pb değerleri arasında ve UHT Yarım Yağlı Süt ile UHT Aromalı Süt Pb değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığın bulunduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Buna karşın, yağsız süt ile diğer süt çeşitleri arasında Pb düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($P>0.05$).

Türkiye’de yapılan çalışmalarda, Temiz ve Soylu (2012) Samsun’daki çiğ sütlerde Pb düzeyini 4 mg/kg, Ayar ve ark. (2009) Konya’daki süt ve süt ürünlerinde 103 mg/kg olarak çalışmada bulunan değerden yüksek (en yüksek 1,51 mg/kg) olarak tespit etmişlerdir. Buna karşın Kan ve Küçükkurt (2018) Afyon’daki kaymakaltı sütle Pb düzeyini 0,001 mg/kg, Kılıç ve Bozkaya (2017) Denizli’nin ilçelerinden tenin ettiği çiğ sütlerde Pb konsantrasyonunu 0,145 mg/kg ile 0,574 mg/kg düzeylerinde saptamış olup, bu değerler İstanbul orijinli sütlerden elde edilen değerlerden daha düşük düzeydedir. Buna göre, elde edilen yüksek miktardaki Pb düzeylerinin hayvanların beslediği alanların sanayi kuruluşları ve otoyollara olan mesafe

ile ilişkili olabileceği öngörülmektedir. Nitekim, otoyolların kenarlarında beslenen hayvanların kurşun elementine maruz kaldığı ve bu hayvanların sütlerinde Pb düzeylerinin nispeten yüksek olabileceği bildirilmektedir (Chary ve ark. 2008). Pb ve Cd çevrede yaygın biçimde bulunmakta olup, genel olarak insan ve hayvanlar için en toksik elementler olarak kabul edilmektedir (Bigucu ve ark., 2016).

Bu çalışmada Cd incelenen süt örneklerinin 64 adedinde (%64) tespit edilmiştir. Cd için süt ve süt ürünleri için limit değeri bulunmamakta olup, 36 adet ısı işlemi görmüş süt numunesinde Cd tespit edilememiştir. En yüksek Cd düzeyi 0,69 mg/kg olup yağlı UHT sütle saptanmıştır (Tablo 2).

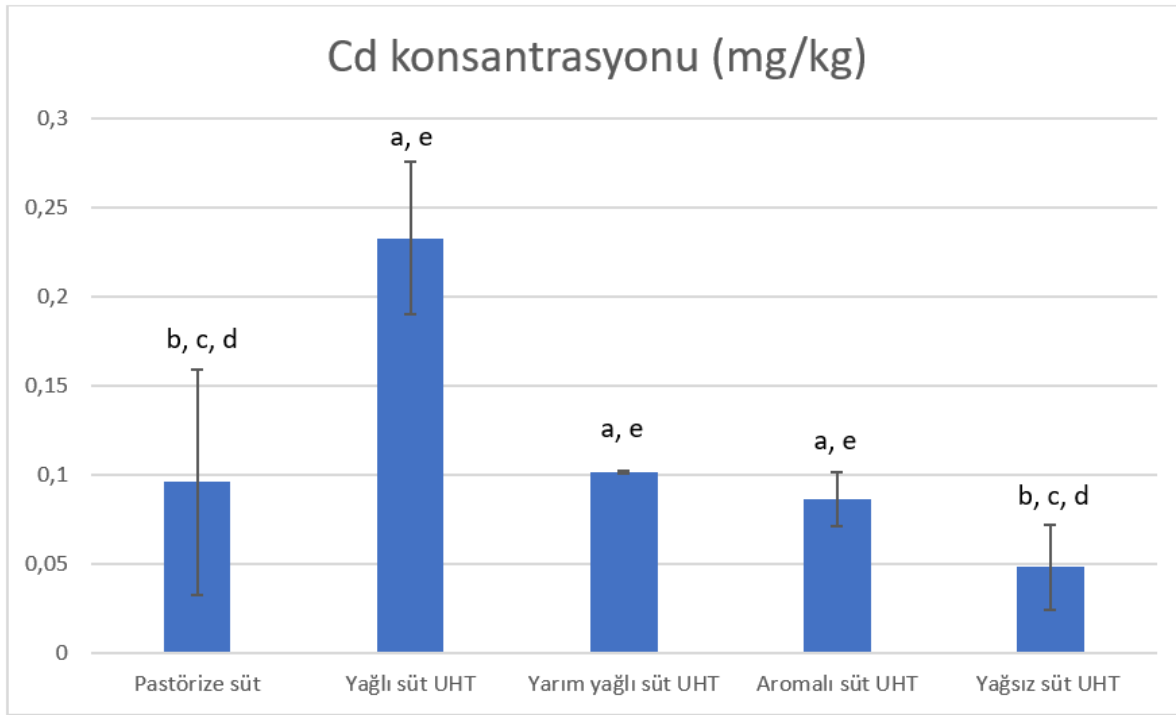
Buna göre, Normallik testinde farklı süt tiplerinde Cd miktarının normal dağılım göstermediği tespit edilmiştir. Bu nedenle, verileri için en uygun test olan Kruskal-Wallis Test uygulanmıştır. Kruskal-Wallis testine göre 5 farklı süt çeşidinin Cd içerikleri karşılaştırılmış ve Cd içeriklerine göre 5 farklı süt çeşidi için istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı oldukları saptanmıştır ($P<0.05$) (Şekil 2).

İstatistiksel olarak Cd değerinin hangi süt çeşitleri arasında anlamlı farklılıkta olduğunu tespit etmek amacıyla ikili gruplar halinde Mann-Whitney Testi gerçekleştirilmiştir. Mann-Whitney Testi doğrultusunda, Pastörize Süt ile UHT Yağlı Süt Cd değerleri, Pastörize Süt ile UHT Yarım Yağlı Süt Cd değerleri ve Pastörize Süt ile UHT Aromalı Süt Cd değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunduğu saptanmıştır ($P<0.05$). Benzer şekilde, UHT Yağlı Süt ve UHT Yağsız Süt Cd düzeyleri arasında, UHT Yarım Yağlı Süt ile UHT Yağsız Süt Cd değerleri arasında ve UHT Aromalı süt ile UHT Yağsız süt arasında Cd düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0.05$).

Table 2. Cadmiyum levels in the milk samples

Tablo 2. Süt numunelerindeki kadmiyum düzeyleri

Örnek Sayısı (n: 100)	Isı işlemi görmüş süt numunelerinde Cd düzeyleri (%)					Toplam
	Pastörize süt (n:10) (%)	Yağlı UHT Süt (n:25) (%)	Yarım Yağlı UHT Süt (n: 20) (%)	Yağsız UHT Süt (n:20) (%)	Aromalı UHT Süt (n:25) (%)	
Tespit edilemedi	10 adet (%100)	12 adet (% 48)	0 adet (% 0)	8 adet (% 40)	6 adet (% 24)	36 (%36)
>0 – 0,69 mg/kg	0 adet (% 0)	13 adet (% 52)	20 adet (% 100)	12 adet (% 60)	19 adet (% 76)	64 (% 64)
Total x-Sx	0	0.0483±0.1397	0.1011 ±0.0475	0.0166 ±0.0241	0.0599±0.0153	



Şekil 2. Isı işlemi görmüş sütler arasındaki Cd konsantrasyonlarının karşılaştırılması ($P < 0,05$). (a) Pastörize Süt, (b) UHT Yağlı Süt, (c) UHT Yarım Yağlı Süt, (d) UHT Aromalı Süt, (e) UHT Yağsız Süt. Cd konsantrasyonu sonuçları ortalama değerler alınarak bağımsız üç ölçümün \pm standart sapmaları ile birlikte kaydedilmiştir. Farklı harflere sahip ortalama değerler önemli ölçüde farklılık göstermektedir ($P < 0,05$).

Figure 2. Comparison of Cd concentrations between heat treated milk ($P < 0,05$). (a) Pasteurized Milk, (b) UHT Whole Milk, (c) UHT Semi-Skimmed Milk, (d) UHT Flavored Milk (e) UHT Skim Milk. The results of the Cd concentrations were recorded together with the \pm standard deviations of three independent measurements, taking the mean values. Average values with different letters differ significantly ($P < 0,05$).

Türkiye’de yapılan çalışmalarda, Çanakkale’den temin edilen süt ve su örneklerinde Cd düzeyi ortalama $0,124 \pm 0,11$ mg/L (Bigucu ve ark. 2016), Ankara’dan temin edilen sütlerde Cd düzeyi 114 mg/kg (Temurci Usta ve Güner 2006), İzmir’den alınan sütlerde $0,07 \pm 0,006$ mg/kg olarak, İstanbul kapsamlı bu çalışmadaki Cd düzeyinden düşük (0,142 mg/kg) sonuçlar elde edilmiştir. Benzer şekilde Kılıç ve Bozkaya (2017) tarafından Denizli’de yapılan diğer bir çalışmada da çiğ sütlerde Cd konsantrasyonu 0,486-0,567 mg/kg düzeylerinde saptanmış olup, bu çalışmada elde edilen bulgulardan daha düşüktür.

Organik Hg bileşikleri inorganik Hg bileşiklerine nazaran daha hızlı ve yüksek düzeyde (%80) emilebilmektedir. Su ürünlerinden özellikle etçil balıkların daha yüksek düzeyde Hg içerdiği bilinmektedir (İlhak 2015). Çalışma kapsamında İstanbul ilinden temin edilen 100 adet ısı işlemi görmüş süt örneğinin hiçbirinde Hg tespit edilememiştir. Bununla birlikte, Ankara’dan temin edilen açık ve kapalı sütlerde Hg düzeyi 0,7 mg/kg ile 1,3 mg/kg (İstanbulluoğlu ve ark. 2013) olarak tespit

edilirken; İstanbul kaynaklı bulgulara benzer olarak, İzmir ilinden elde edilen süt numunelerinde Hg tespit edilememiştir (Gövercin 2010). Çalışma kapsamında İstanbul orijinli ısı işlemi görmüş sütlerde Hg tespit edilememesi gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından olumlu olarak değerlendirilmektedir.

Yeryüzünde sıklıkla bulunabilen ve riskli bir ağır metal olan As, insan ve hayvanlar tarafından daha çok içme suyu yoluyla alınmaktadır. Araştırma kapsamında İstanbul ilinden temin edilen 100 adet ısı işlemi görmüş süt örneğinin hiçbirinde As tespit edilememiştir. Buna karşın, Afyon’da kaymakaltı sütlerde 0,04 mg/l (Kan ve Küçükkurt 2018), Ankara’da açık sütlerde 0,59 mg/kg (İstanbulluoğlu ve ark. 2013), Konya’da süt ve süt ürünlerinde 0,15 mg/kg (Ayar ve ark. 2009) ile İzmir’den temin edilen süt örneklerinde ise ortalama $0,046 \pm 0,127$ mg/kg düzeyinde As tespit edilmiştir. İstanbul kaynaklı ısı işlemi görmüş sütlerde As tespit edilememesi gıda güvenliği halk sağlığı açısından olumlu olarak değerlendirilmektedir.

SONUÇ

Süt ve süt ürünlerindeki ağır metal seviyelerinde teknolojik uygulamalar ve kullanılan metal kaplar belirleyici olmakta ve asitliği yüksek olan süt ürünlerinin de ağır metalleri bağlama özelliğinde olmasının, halk sağlığı açısından önemli risk unsuru olarak değerlendirilmesine neden olmaktadır. Bu bağlamda, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından arsenik ve kurşun başta olmak üzere birçok ağır metalin karsinojen (Grup I) veya muhtemel karsinojen (Grup 2) kategorisinde yer alması ile gıda maddelerine ağır metal kontaminasyonu sonucu; insanlarda başta nörotoksik, karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etkiler gibi ciddi etkilerin meydana gelmesi, toplumda endişeyi önemli düzeyde artırmaktadır. Nitekim, bu çalışma kapsamında piyasada tüketim amacıyla satışa sunulan pastörize ve UHT sütlerde ağır metallerden kurşun ve kadmiyum tespit edilirken, arsenik ve cıvanın tespit edilememesi gıda hijyeni ve halk sağlığı açısından nispeten olumlu olarak değerlendirilmektedir. Sonuç olarak, halk sağlığının korunması açısından ilgili birçok meslek grubu ile gıda endüstrisinde yer alan işletmelerin konunun hassasiyetini göz önünde bulundurarak, ivedilikle birlikte çalışma ve ortak eylem planı oluşturmaları için etkin faaliyette bulunmaları, süt ve süt ürünlerinde kalıntı sorununun kontrol altına alınması açısından etkili olacağı değerlendirilmektedir.

Açıklama: Bu çalışma, ilk isimli yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Etik Kurul Bilgisi: Çalışma kapsamında etik kurul onay belgesine ihtiyaç bulunmamaktadır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Finansal Destekler: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No 10327).

REFERENCES

- Anonim.** Vapor Generation Accessory VGA-77 Operation manual. VARIAN. Publication no. 8510104700 2004: 70 page.
- Anonim.** Agilent 700 Series ICP Optical Emission Spectrometers User's Guide. 2018. 42 p.
- Anonim.** NMKL. Metals. Determination by atomic absorption spectrophotometry after wet digestion in a microwave oven No:161, Nordic Committee on Food Analysis, Norway 1998. p.8.
- Anonim.** Dünyada ve Türkiye'de Süt Sektör İstatistikleri. 2019 Süt Raporu. 2019. p 77.
- Anonim.** <https://ulusalsutkonseyi.org.tr/uretimler/> Erişim tarihi: 14.01.2021.
- Ayar A, Sert D, Akın N.** The trace elements levels in milk and dairy products consumed in middle Anatolia-Turkey. Environ Monit Assess 2009; 152(1):1-12.

- Aydın A, Vural A.** İçme Sütü Teknolojisi In: Süt Hijyeni ve Teknolojisi, Ed; Ormancı FSB., 1. Baskı, Ankara Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, Türkiye. 2020; pp.45-66.
- Bayrakal GM, Aydın A.** Sütteki Kontaminantlar In: Süt ve Süt Ürünleri, Ed; Atasever M., 1. Baskı, Türkiye Klinikleri, Ankara, Türkiye. 2019; pp.114-119.
- Bigucu E, Kaptan B, Palabıyık I, Oksuz O.** The effect of environmental factors on heavy metal and mineral compositions of raw milk and water samples Tekirdağ Ziraat Fakültesi Derg 2018; 13(4): 61-70.
- Cıdroğlu Z, Aydın A.** Piyasada satışa sunulan ısı işlemi görmüş içme sütlerinde ağır metal kalıntılarının varlığı üzerine araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, 2020; 43 sayfa.
- Chary NS, Kamala CT, Raj DS.** Assessing risk of heavy metals from consuming food grown an sewage-irrigated soils and food chain transfer. Ecotoxicol Environ Saf 2008; 69(3); 513-524.
- Commission Regulation (EC) (2002).** Amending Regulation (EC) no. 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. OJEC. No.472, L75/18-20, 16.03.2002.
- Gövercin İ.** İzmir ilinde sütlerde bazı ağır metal (Kurşun, kadmiyum, arsenik, cıvai bakır, çinko) düzeylerinin belirlenmesi. Ege Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2010; 106 sayfa.
- İlhak Oİ.** Gıdalarda ağır metaller. Türkiye Klinikleri Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Dergisi-Özel Sayı 2015; 1(1): 18-27.
- İnci A, Aypak SÜ, Güven G.** Aydın ilinde üretilen inek sütlerinde bazı ağır metal düzeylerinin araştırılması. Gıda; 42(3); 229-234.
- İstanbulluoğlu H, Oğur R, Tekbaş ÖF, Bakır, B. (2013).** Heavy metal contamination in milk and dairy products. Türkiye klinikleri J Med 2013; 33(2): 410-419.
- Kan F, Küçükkurt İ.** Afyon manda kaymağı ve kaymaklatı sütlerde bazı ağır metallerin ICP-MS ile karşılaştırılması. Kocatepe Vet J 2018; 11(4): 447-453.
- Kılıç Altun S, Paksoy, N. Durmaz H.** Sütün Mineral İçeriği, In: Süt ve Süt Ürünleri, Ed; Atasever M., 1. Baskı, , Ankara, Türkiye. 2019; pp.82-85.
- Kılıç M, Bozkaya O.** Çiğ süt örneklerinde ağır metal ve metal kontaminasyonlarının belirlenmesi ve sağlık üzerine etkileri. Ankara Sağlık Hiz Derg. 2017; 16(1): 1-9.
- Özel G.** Tüketicilerin süt tercihinde etkili olan faktörlerin incelenmesine yönelik bir araştırma. Süleyman Demirel Üniversitesi İİBF Derg. 2008; 13(3): 227-240.
- Sancak YC, İşleyici Ö, Tuncay RM.** Süt ve Süt Ürünlerinde Kimyasal Kalıntı Problemi ve Sağlık Üzerine Etkileri. In: Süt ve Süt Ürünleri, Ed; Atasever M., 1. Baskı, Türkiye Klinikleri, Ankara, Türkiye. 2019; pp. 120-132.
- Simsek O, Gültekin R, Öksüz O., Kurultay S.** The effect of environmental pollution on the heavy metal content in raw milk. Nahrung 2000; 44(5): 360-363.
- Temiz H, Soylu A.** Heavy metal concentrations in raw milk collected from different regions of Samsun, Turkey. Int J Dairy Technol 2012; 65(4): 516-522.
- Temurci Usta H, Güner A.** Ankara'da tüketime sunulan süt ve beyaz peynirlerde ağır metal kontaminasyonu. Atatürk Üniv. Vet. Bil. Derg. 2006; 1(1-2): 20-28.
- Türk Gıda Kodeksi.** Gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkında tebliğ. Tebliğ no: 2008/26. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2008/05/20080517-7.htm> Erişim tarihi: 05.01.2021.
- Yılmaz Aksu F, Sandıkçı Altunatmaz S.** Gıdalarda ağır metal bulaşmalarına bağlı riskler. Türkiye Klinikleri Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Dergisi-Özel Sayı 2017; 3(3): 218-230.

Alteration of Boza Microbiota in the Fermentation Process

Murat Kavruk¹, Mediha Nur ZAFER YURT², Behiye Büşra TAŞBAŞI², Elif Esmâ ACAR², Ali SOYUÇOK³, Osman ALTUNBAŞI⁴, Veli Cengiz ÖZALP⁵, Mert SUDAĞIDAN^{2*}

¹Turkish Standards Institution (TSE), Test and Calibration Center, Gebze 41400, Kocaeli, Turkey

²Konya Food and Agriculture University, KIT-ARGEM R&D Center, Meram, 42080, Konya, Turkey

³Mehmet Akif Ersoy University, Agriculture, Livestock and Food Research and Application Center, 15030, Burdur, Turkey

⁴Konya Food and Agriculture University, SARGEM, Meram, 42080, Konya, Turkey

⁵Atilim University, Medical School, Department of Medical Biology, 06830, Ankara, Turkey

ABSTRACT

Boza is a fermented beverage containing beneficial microorganisms for human health. In our study, microbiota present in raw materials used boza production (corn flour, wheat flour, and mayşe), 1st day, 3rd day of boza fermentation and 4th day final product of boza, has been identified by Next Generation DNA Sequencing and metagenomic analysis. As a result of genus-level analysis directly from corn flour and wheat flour samples contained dominantly *Streptophyta* and *Pleomorphobacterium*, while in the 1st day, 3rd day, the final product of boza and boza ferment the dominant bacteria were *Leuconostoc* and *Lactococcus* at genus level. In the analysis of the pre-enriched samples, the dominant bacteria in corn flour were *Enterococcus*, *Klebsiella*, and *Micromonospora* and in wheat flour were *Pantoea* and *Bacillus*. Boza ferment, boza on the 1st day, boza on the 3rd day and the final product of boza dominantly contained *Lactococcus*. The bacterial diversity, similarity and differences among samples were analyzed by Principal Coordinate Analysis and dendrogram construction. The contribution of raw materials used in the production of boza change to the products at the fermentation stage and to the microbiota during the fermentation process and their contribution to the final product were determined by metagenomic analysis at DNA level.

Keywords: Boza, Lactic acid bacteria, Metagenomic analysis, Microbiota

Boza Mikrobiyotasının Fermantasyon Sürecindeki Değişimi ÖZ

Boza, insan sağlığı için yararlı mikroorganizmaları içeren fermente bir içecektir. Çalışmamızda boza üretiminde ham madde olarak kullanılan (mısır unu, buğday unu, mayşe) ve boza fermantasyonunun 1. günü, 3. günü ve 4. gün son ürün boza'nın içerdiği mikrobiyota Yeni Nesil DNA Dizileme yöntemi ve metagenomik analiz ile ortaya çıkarılmıştır. Örneklerden doğrudan cins düzeyinde yapılan analiz sonucunda, mısır unu ve buğday ununda dominant olarak *Streptophyta* ve *Pleomorphobacterium* bulunurken; bozanın 1. gün, 3. gün ve son ürün ile boza mayasında dominant bakterilerin *Leuconostoc* ve *Lactococcus* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. Ön zenginleştirme yapılan örneklerin analizinde, mısır ununda dominant bakteriler *Enterococcus*, *Klebsiella* ve *Micromonospora*, buğday ununda ise *Pantoea* ve *Bacillus* olduğu, boza mayası, 1. gün boza, 3. gün boza ve satışa sunulan son üründe dominant bakteri *Lactococcus* olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda örnekler arasındaki bakteriyel çeşitlilik, benzerlik ve farklılıklar Principal Coordinate Analiz ve dendrogram oluşturulması ile ortaya konmuştur. Boza üretiminde kullanılan ham maddelerin bozanın fermantasyon aşamalarındaki ürünler ile fermantasyon sürecinde mikrobiyotasına nasıl değiştiği ve son ürüne olan katkıları, DNA düzeyinde yapılan metagenomik analizler ile belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Boza, Laktik asit bakterileri, Metagenomik Analiz, Mikrobiyota

To cite this article: Kavruk M, Zafer Yurt M.N, Taşbaşı B.B, Acar E.E, Soyuçok A, Altunbaş O, Özalp V.C, Sudağidan M. Alteration of Boza Microbiota in the Fermentation Process. Kocatepe Vet J. (2021) 14(2): 238-246.

Submission: 13.03.2021 Accepted: 06.05.2021 Published Online: 27.05.2021

ORCID ID; MK: 0000-0001-5331-7253, MNYZ: 0000-0002-3064-3811, BBT: 0000-0002-2076-3756, EEA: 0000-0002-6264-7550, AS: 0000-0003-2626-5827, OA: 0000-0003-1840-628x, VCCÖ: 0000-0002-7659-5990, MS: 0000-0002-3980-8344

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

GİRİŞ

Probiyotik gıdaların tüketimi insan sağlığı, gelişimi ve bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesi için son derece önemlidir. Bağırsak mikrobiyotasının insan beyin gelişimi ve psikolojik durumunda önemli bir rol üstlendiği yapılan birçok çalışma ile ortaya konmuştur (Smith 2015, Settanni ve ark. 2021, Spichak ve ark. 2021, Troyer ve ark. 2021). İnsan bağırsak mikrobiyotasının obezite ile de doğrudan ilişkili olduğu, son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Bliss ve Whiteside 2018, Rovella ve ark. 2021, Wilkins ve Reimer 2021). Prebiyotik gıdalar bağırsak mikrobiyotasını oluşturan mikroorganizmaların özellikle de bakterilerin başlıca enerji ve beslenme kaynaklarıdır. Prebiyotik gıdaların tanımı güncellenmiştir. Bu bağlamda bir gıdanın prebiyotik tanımına uyabilmesi için sağlık üzerine olumlu katkıları bulunan mikroorganizmalar tarafından seçici substrat olarak kullanılması gerektiği belirtilmiştir (Gibson ve ark. 2017).

Fermentasyon, kullanılan en eski ve etkili gıda muhafaza yöntemlerinden biridir. Fermente gıdaların da tanımı yakın zamanda tekrar güncellenmiş olup, istenilen mikrobiyal çoğalma ve gıda bileşenlerinin enzimatik dönüşümlerini içeren gıda veya içecek olarak belirtilmiştir (Marco ve ark. 2021). Fermentasyon sonucunda gıda ortamında asitliğin artması, pH'nın düşmesi ve antimikrobiyal metabolitlerin oluşması bu yöntemin temelini oluşturmaktadır (Palamutoğlu ve Baş 2020). Laktik asit bakterileri (LAB), mayalar ve asetik asetik bakterileri fermente gıdaların üretilmesinde yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalardır (De Vuyst ve Leroy 2020). Fermente probiyotik gıdalar, canlı mikroorganizmalar içermesi nedeniyle sağlık üzerinde yararlı etkileri vardır. Bu olumlu etkiler özellikle içerdikleri canlı mikroorganizmalar, LAB ve bunların bağırsak mikrobiyotası üzerine olumlu etkileri, besin sindirimine katkıları ve ürettiği biyoaktif maddelerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle boza da bu sınıfta değerlendirilmektedir (Marco ve ark. 2021).

Boza, alkolsüz, viskozitesi yüksek ve hafif asitli fermente bir içecektir. Bozanın ilk çıkışını 9000 yıl önce Mezopotamya'ya dayandıran kaynaklar yanında, Orta Aysa'da Türklerin göçleri ile dünyada farklı bölgelere yayıldığı ve bu bölgelerde farklı isimler aldığı bilinmektedir. Balkan ülkelerinden (Bulgaristan, Arnavutluk) Türkmenistan ve Kırgızistan'a kadar farklı coğrafyalarda farklı malzemelerle üretilen boza, her bölgede geleneksel bir içecek olarak tüketilmektedir (Çakır 2019). Genel olarak boza, LAB ve mayaların tahıl (darı, mısır, buğday veya pirinç unu) ürünlerini fermente etmesiyle elde edilen geleneksel bir fermente içecek olarak tanımlanmaktadır (Arici ve Daglioglu 2002). Boza fermentasyonunda homo ve hetero-fermantatif LAB ve mayaların görev alarak heterojen boza mikrobiyotasını oluşturduğu bilinmektedir (Gotcheva ve ark. 2000, Altay ve ark. 2013). Boza mikrobiyotasındaki değişkenlik

üretiminde kullanılan ham maddelerin farklı olması, üretim tekniklerindeki ve depolama koşullarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Gotcheva ve ark. 2001, Botes ve ark. 2007).

Boza fermentasyonu boyunca LAB, organik asit, ekzopolisakkarit, antimikrobiyal maddeler ve fitaz gibi yararlı metabolitleri ürettiği ortaya çıkarılmıştır (Doğan ve Tekiner 2020). Ayrıca boza da bulunan *Lactobacillus pentosus* (Todorov ve Dicks 2007), *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* (Altay ve ark. 2013) ve *Lb. brevis* (Dogan ve Ozpinar 2017) probiyotik özellik gösterdiği ve *Lb. pentosus*'un bakteriyosin üreticisi olduğu da tespit edilmiştir (Todorov ve Dicks 2007). Diğer bir çalışmada, bozadan izole edilen *Enterococcus faecium* ST10Bz suşunun *Listeria monocytogenes*'e karşı etkili bakteriyosin ürettiği bulunmuştur (Valledor ve ark. 2020). Cholakov ve ark. (2017) bozadan izole ettikleri *Leuconostoc lactis* BT17 suşunun *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. ve *Klebsiella pneumonia* üzerine antimikrobiyal özellik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Kültüre dayalı yöntemlerde boza içeriğindeki mikrobiyotanın belirlenmesinde seçici ayırt edici besiyerleri kullanılarak sadece hedef mikroorganizmalar tespit edilebilmektedir. Bu çalışmada ise, DNA tabanlı Yeni Nesil DNA Dizileme (Next Generation DNA Sequencing, NGS) yöntemi kullanılarak boza üretiminde ham madde olarak kullanılan gıda maddeleri ve bozanın fermentasyon aşamalarından alınan örnekler içerisinde bakteri çeşitliliği ve bu bakterilerin analiz edilen örnek içerisinde bulunma oranları ve satışa sunulan son ürün şeklindeki boza mikrobiyotasına olan katkıları ve fermentasyon sürecinde mikrobiyotanın nasıl değiştiği metagenomik analiz ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Boza Örneklerinin Toplanması

Boza yapımında kullanılan gıda maddeleri, mayşe, boza mayası ve boza'nın fermentasyon aşamalarındaki örnekler (1. ve 3. gün) ve satışa sunulan son ürün (4. gün) Isparta ilinde lokal olarak boza üretimi yapan bir üreticiden üretimin her aşamasında steril tüpler içerisine Ekim 2019 tarihinde alınmıştır. Örnekler: ham madde (mısır unu ve buğday unu), mayşe, bir önceki bozadan elde edilen boza mayası, fermentasyonun 1. günü, 3. günü ve 4. gün son ürün boza olmak üzere toplam 7 adet örnek alınmıştır. Örnekler çalışılincaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Boza yapımında geleneksel yöntemler kullanılmaktadır. Üretici, mısır unundan %50 ve buğday unundan %50 olacak şekilde hazırlanan un karışımının 5 katı ağırlığı suyla (w/v) ezilerek 1 saat boyunca kaynatmıştır. Bir gece dinlendirildikten sonra hacmi kadar su ilave edilerek süzülükten sonra %20 (w/v) şeker ilave edilmiştir. Bir önceki bozadan %2 (v/v) oranında ilave edildikten sonra 25 °C sıcaklıkta 3 gün fermentasyona bırakılmıştır. 3. günün sonunda boza +4 °C'ye alınarak depolanmıştır. Üretilen boza

bir gün dinlendirilmiş ve 4. günden sonra son ürün olarak satışa sunulmaya hazır hale getirilmiştir.

Örneklerden Doğrudan DNA Ekstraksiyonu

Boza ve boza yapımında kullanılan ham maddelerden 1 gr aseptik koşullarda biyogüvenlik kabini (DemAir Class IIA2, Türkiye) içerisinde tartılarak 9 ml peptonlu su (CM0509B, Oxoid, İngiltere) içerisinde stomacher'da homojenize edildikten sonra DNeasy® PowerFood® Microbial kiti (Qiagen, Almanya) tarafından önerilen protokol takip edilerek direkt ham madde ve boza örneklerinden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri 100 µl elüsyon tamponu içerisinde çözündürülmüş, DNA kantitasyonu Take3 plate kullanılarak mikropilaka okuyucuda (Epoch-2, BioTek, ABD) 260 ve 280 nm'de ölçülerek belirlenmiştir. DNA örnekleri amplikon polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çalışmalarına kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Örneklerden Ön zenginleştirme Sonrası DNA Ekstraksiyonu

Boza ve boza yapımında kullanılan ham maddelerden 1 gr aseptik koşullarda biyogüvenlik kabini (DemAir Class IIA2, Türkiye) içerisinde tartılarak 9 ml peptonlu su (CM0509B, Oxoid) içerisine alınmış ve 35 °C'de 24 saat 200 rpm'de çalkalanarak inkübe edilerek ön zenginleştirmeye tabi tutulmuştur. Ön zenginleştirme işlemi sonrasında kültürlerden 1 ml alınarak santrifuj edilmiş ve elde edilen pellet 4 mg/ml lizozim (Applichem, Almanya) ve 10 µg/ml lizostafin (Sigma, Almanya) içeren 500 µl 1×TE tamponu içerisinde çözündürülmüştür. Liu ve ark. (2004) tarafından önerilen fenol/kloroform/izoamil alkol yöntemi kullanılarak toplam DNA izole edilmiş ve DNA örnekleri 50 µl steril ultra saf su içerisinde çözündürülerek kantitasyonu yapılmış ve amplikon PZR çalışmalarına kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Yeni Nesil DNA Dizileme

Elde edilen toplam DNA örneklerinden amplikon PZR çalışmaları bakterilere özgü universal 16S rRNA V3-V4 gen bölgeleri adaptör DNA dizileri içeren primerler kullanılarak ve 16S metagenomik kütüphane hazırlama protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Illumina, California, ABD). F-primer

5'-

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGA
CAGCTACGGGNGGCWGCAG-3' ve R-primer

5'-

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAG
ACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

16S rRNA gen bölgesinin PZR ile çoğaltılmasında KAPA HiFi HS Mix (Roche, Almanya) kullanılmış ve örneklerin Yeni Nesil DNA Dizileme sisteminde ayırt edilmesini sağlayan index PZR için Nextera® XT index Kit v2 Set-A (Illumina) kiti kullanılmıştır. DNA örneklerinin temizlenmesinde AMPure XP beads

(Beckman Coulter, ABD) ve temizlenen DNA örneklerinin miktarlarının belirlenmesinde AccuBlue® NextGen dsDNA Quantitation kiti (Biotium, Inc., Fremont, CA, ABD) multimode mikropilaka okuyucu (Mithras² LB943, Berthold, Almanya) kullanılmıştır. Yeni Nesil DNA Dizileme işlemi iSeq100 sisteminde (Illumina) gerçekleştirilmiştir.

Metagenomik Analiz

Yeni Nesil DNA Dizileme sisteminden elde edilen diziler 16S Metagenomics (Version: 1.1.0, Illumina) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir ve örneklerin içerisindeki bakteriyel çeşitlilik alem (kingdom) düzeyinden tür (species) düzeyine kadar belirlenmiştir. Shannon species diversity indeks, Principal Coordinate Analysis (PCoA) ve elde edilen dizilerden oluşturulan dendrogram çiziminde 16S Metagenomics (Version: 1.1.0, 2021) yazılımı kullanılmıştır.

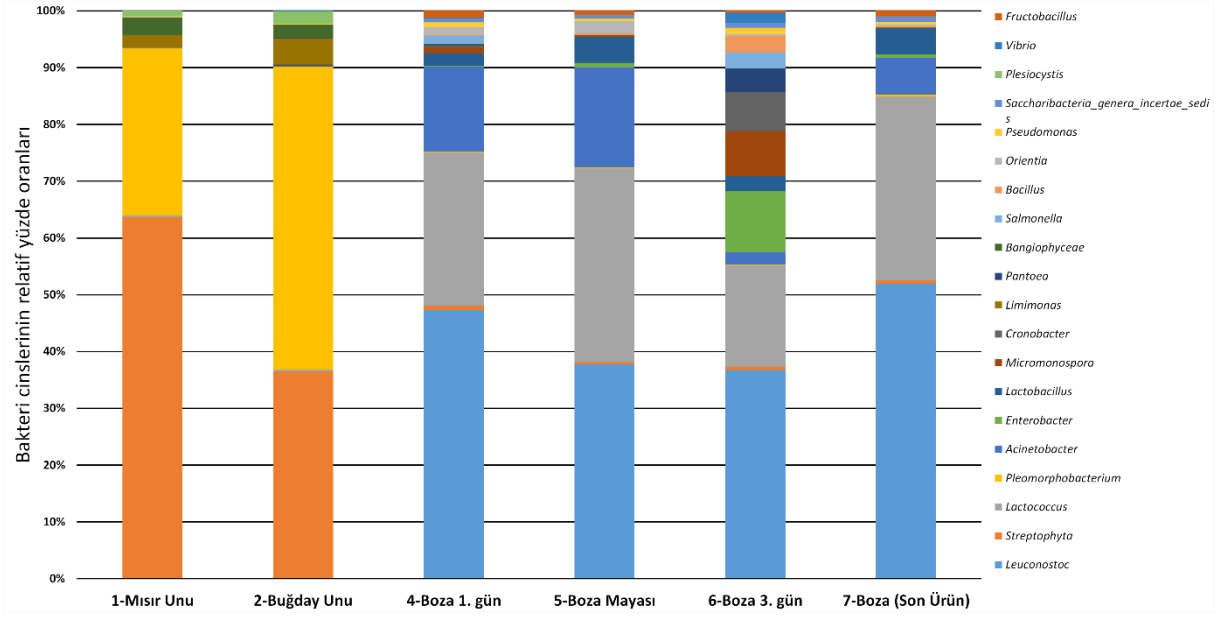
BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmamız kapsamında boza üretiminde ham madde olarak kullanılan gıda maddelerinin ve bozanın üretim aşamalarından alınan örneklerin içerdiği mikrobiyota Yeni Nesil DNA Dizileme yöntemi ve metagenomik analiz ile ortaya çıkarılmıştır. Çalışma iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir: Örneklerden doğrudan DNA ekstraksiyonu ve örneklerden ön zenginleştirme sonrasında DNA ekstraksiyonu. Analiz edilen gıda ham maddesi veya boza örneğinin içerdiği mikrobiyota (doğrudan örnekten izolasyon ile) ve ön zenginleştirme ile çoğaltma sonrasındaki mikrobiyota karşılaştırılmıştır. Örneklerden doğrudan DNA ekstraksiyonu ardından yapılan metagenomik analiz sonucunda mısır unu ve buğday ununda dominant bakteriler, cins düzeyinde *Streptophyta* (2745 okuma mısır unu ve 1262 okuma buğday unu) ve *Pleomorphobacterium* (1854 okuma buğday unu ve 1272 okuma mısır unu) olarak belirlenmiştir. Bozanın 1. gün (*Leuconostoc* 1160 okuma ve *Lactococcus* 659 okuma), 3. gün (*Leuconostoc* 2199 okuma ve *Lactococcus* 1070 okuma) ve son ürün (*Leuconostoc* 1825 okuma ve *Lactococcus* 1138 okuma) ile boza mayasında (*Leuconostoc* 1229 okuma ve *Lactococcus* 1113 okuma) baskın bakteriler cins düzeyinde *Leuconostoc* ve *Lactococcus* olarak tespit edilmiştir (Şekil 1). Boza örneklerinde tür düzeyinde yapılan incelemede baskın olarak *Leu. lactis* ve *Leu. palmae* ile *L. raffinolactis* bulunmuştur. Mayşe örneğinden direkt DNA ekstraksiyonu sonrasında bakteriyel 16S rRNA gen bölgesi amplifiye edilememiştir, bu durum içerdiği bakteri sayısının çok az olduğu şeklinde açıklanmıştır. Diğer yandan ön zenginleştirme sonrasında örneklerden DNA ekstraksiyonu ardından yapılan metagenomik analiz sonucunda mısır ununda dominant bakteriler cins düzeyinde en yüksek bulunma oranlarına göre *Enterococcus* (3080 okuma), *Klebsiella* (1523 okuma), *Micromonospora* (927 okuma) ve *Salmonella* (787 okuma), buğday ununda ise *Pantoea* (1319 okuma), *Bacillus* (1220 okuma), *Micromonospora*

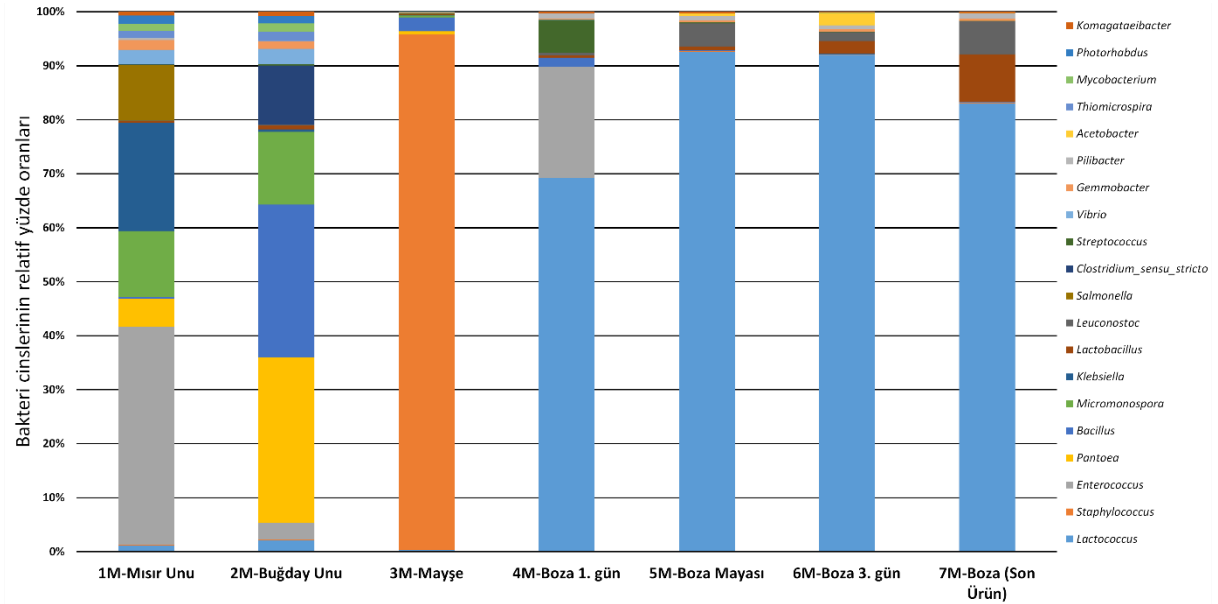
(580 okuma) ve *Clostridium sensu stricto* (471 okuma) olarak belirlenmiştir (Şekil 2). *Lactococcus* cins düzeyinde dominant bakteri olarak boza mayasında (7176 okuma), 1. gün (3871 okuma), 3. gün (7682 okuma) ve satışa sunulan son üründe (7097 okuma) tespit edilmiştir. Sadece 1. gün boza örneğinde *Lactococcus*'tan sonra en yüksek oranda *Enterococcus* (1153 okuma) cinsi bakterilerin olduğu belirlenmiştir. Tür düzeyindeki analizde boza örneklerinde dominant olarak *L. raffinolactis* ve *L. hirvilactis* tespit edilmiştir. Mayşe örneğinde ise *Staphylococcus* (11048 okuma) dominant olarak tespit edilmiştir (Şekil 2). Direkt örneklerde ve ön zenginleştirme sonrası örneklerde bakteri çeşitliliğinin karşılaştırılmasında metagenomik analiz sonucunda elde edilen Shannon species diversity indeks ve tanımlanan toplam tür sayısı verileri kullanılmıştır (Tablo 1). Bu bağlamda mısır unu, buğday unu ve 1. gün boza örneğinde ön zenginleştirme ile içerdikleri bakteri sayısı tür düzeyinde arttığı belirlenirken boza mayası, 3. gün boza ve son ürün bozada ise doğrudan örnekler içerisinde tanımlanan bakteri sayısının tür düzeyinde ön zenginleştirmeden daha yüksek sayıda olduğu bulunmuştur (Tablo 1). PCoA belirlenen taksonomik sınıflandırmaya göre benzerliklere ve farklılıklara göre örnekler arasındaki dağılımı ölçen bir yöntemdir. Doğrudan örneklerden yapılan PCoA sonucunda cins düzeyinde mısır unu (örnek no: 1) ve buğday unu (örnek no: 2), diğer analiz edilen numunelerden farklı olduğu görülmüştür (Şekil 3). Diğer yandan ön zenginleştirme sonrası örneklerinden yapılan PCoA analizinde ise 5M-boza mayası, 6M-boza 3. gün ve 7M-boza son ürün benzer çıkmıştır. 1M-mısır unu ve 2M-buğday unu birbirine yakın dağılım gösterirken 3M-mayşe ve 4M-boza 1. gün örneği birbirinden ve diğer analiz edilen örneklerden farklı dağılım gösterdiği görülmüştür (Şekil 4). Metagenomik analiz kullanılarak cins düzeyinde örnekler arasındaki hiyerarşik kümeleme analizi ile elde edilen dendrogram Şekil 5'te gösterilmiştir. Bu analiz ile doğrudan örnekler kullanılarak sekans sonucunda cins düzeyinde 6-boza 3. gün örneği diğerlerinden farklı bir profil göstermiştir. Dendrogramdaki kümelenmeler incelendiğinde 1-mısır unu ve 2-buğday unu örnekleri ile 4-boza 1. gün ve 7-boza son ürün örnekleri arasında yakın homoloji olduğu görülmüştür (Şekil 5A). Diğer yandan ön zenginleştirmeye tabi tutulan örneklerden sekans sonucunda cins düzeyindeki dendrogram incelendiğinde 3M-mayşe örneği diğer tüm analiz edilen ön zenginleştirmeye tabi tutulan örneklerden farklı olduğu, 1M-mısır unu ve 2M-buğday unu ile 5M-boza mayası ve 6M-boza 3. gün arasında cins düzeyinde yakın homoloji olduğu belirlenmiştir (Şekil 5B). Boza mikrobiyotasının içerdiği bakteri çeşitliliğini belirlemeye yönelik yapılan önceki çalışmalarda genellikle kültüre dayalı yöntemler kullanılmıştır. Yapılan bir çalışmada, boza içerisindeki bakteriler incelendiğinde LAB baskın olduğu ve LAB:maya oranının 2.4 olduğu ifade edilmiştir (Gotcheva ve ark.

2000, Levent ve Cavuldak 2017). LAB arasında laktobasiller bozada yaygın olarak bulunmaktadır (Baschali ve ark. 2017). Ayrıca, Hancıoğlu ve Karapınar (1997) yaptıkları bir çalışmada bozada baskın olarak bazı *Leuconostoc* (*Leu. paramesenteroides* (%25.6), *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (%18.6) ve *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (%7.3)) türleri ile *Lb. sanfrancisco* (%21.9) ve *Lb. coryniformis* (%9.1) rapor ederken Gotcheva ve ark. (2000) *Lb. coprophilus* ve *Leu. raffinolactis*'i raporlamışlardır. Arıcı ve Daglioglu (2002) bozada *Lb. sanfrancisco*, *Lb. coryniformis*, *Lb. confusus*, *Lb. fermentum*, *Leu. oenos*, *Leu. mesenteroides* ve *Leu. paramesenteroides*'in bulunduğunu ifade etmişlerdir. Boza içeriğindeki bakterileri belirlemeye yönelik yapılan benzer bir çalışmada *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. rhamnosus* ve *Lb. fermentum* tespit edilmiştir (Botes ve ark. 2007). Kıvanç ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada 10 boza örneğinden 45 farklı LAB izole etmişler ve bu bakterileri RiboPrinter® mikrobiyal karakterizasyon sistemi ile tanımlamalarını yapmışlardır. Çalışma sonucunda en yüksek oranda *Lactobacillus* spp. özellikle de *Lb. plantarum* (n:24) ve *Leu. citreum* (n:5) tespit etmişlerdir. *Lactococcus*, *Enterococcus* ve *L. lactis* ise düşük oranlarda tespit edilmiştir. Borcaklı ve ark. (2018) 3 boza örneğinden yaptıkları çalışmada baskın olarak *Pediococcus*, *Leuconostoc* spp. ve *Lactobacillus* spp. bakterilerini izole etmişlerdir. Osimani ve ark. (2015) 3 adet pastörize edilmemiş Bulgaristan bozası üzerine yaptıkları çalışmada 20 bakteri suşu izole etmişler ve bunların karakterizasyonunda 19/20 adedi *Lactobacillus* spp. olarak belirlenmiş ve dominant türler moleküler testler ile *Lb. parabuchneri* (7/20) ve *Lb. casei* group (7/20) olarak tespit edilmiştir. Boza içeriğindeki mikrobiyota bakterilerinin özellikle de laktik asit bakterilerinin farklı olması kullanılan ham maddelerin ve üretim tekniklerinin farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Boza fermente bir ürün olması açısından raf ömrü kısadır. Ticari ve ev ortamında gerçekleştirilen boza üretiminden sonra soğutulmuş +4 °C'de muhafaza edilmekte ve en fazla 12 gün içerisinde tüketilmesi önerilmektedir (Bayat ve Yıldız 2019). Boza mikrobiyotasında bakteriyosin üreten LAB bulunması, ürünün raf ömrünü arttırmaktadır (Lindgren ve Dobrogosz 1990). Boza içeriğindeki mikrobiyotanın korunması ve bağırsak mikrobiyotasına faydalı olabilmesi için uygun muhafaza koşullarında depolanması gerekmektedir. Boza içerisine lizozim ve nisin ilavesinin içeriğindeki laktik asit bakterilerini koruyarak raf ömrünü uzattığı ve duyuşal değerlerini değıştürmeği görülmüştür (Sozbilen ve ark. 2018).



Şekil 1: Örneklerden (1-7) doğrudan DNA ekstrasyonu sonrasında içerdikleri bakterilerin cins düzeyinde metagenomik analizi. En yüksek tespit edilen 20 bakteri cins düzeyinde gösterilmiştir.
Figure 1: Metagenomic analysis of the bacteria at genus level after direct DNA extraction from the samples (1-7). Top 20 identified bacteria were shown at the genus level.

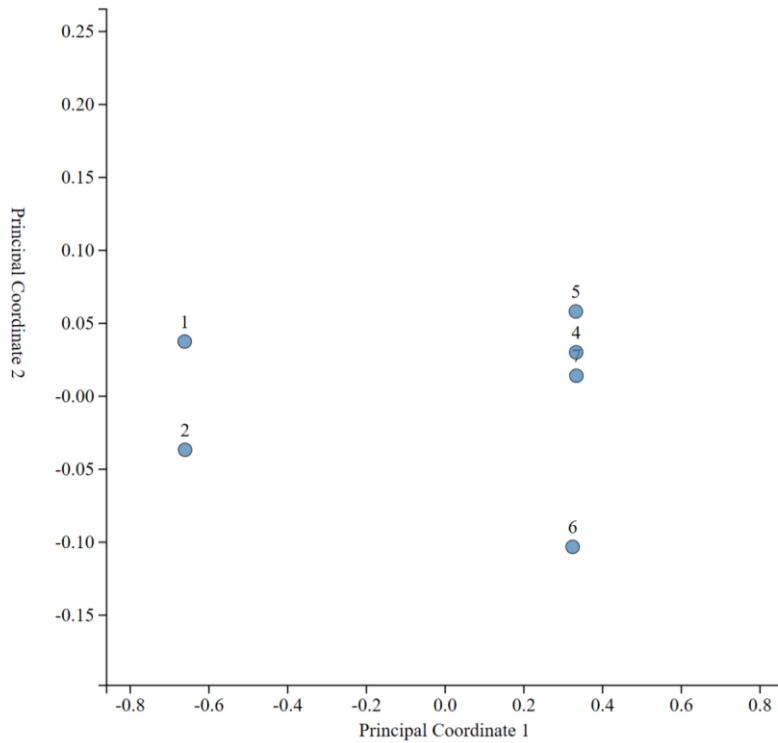


Şekil 2: Örneklerden (1M-7M) ön zenginleştirme sonrasında DNA ekstrasyonu ile içerdikleri bakterilerin cins düzeyinde metagenomik analizi. En yüksek tespit edilen 20 bakteri cins düzeyinde gösterilmiştir.
Figure 2: Metagenomic analysis of the bacteria at genus level after DNA extraction from pre-enriched samples (1M-7M). Top 20 identified bacteria were shown at the genus level.

Tablo 1. Boza örneklerinden doğrudan ve ön zenginleştirme ile elde edilen DNA içerisindeki bakteriyel çeşitlilik değerleri (Shannon species diversity indeks ve tanımlanan tür sayısı)

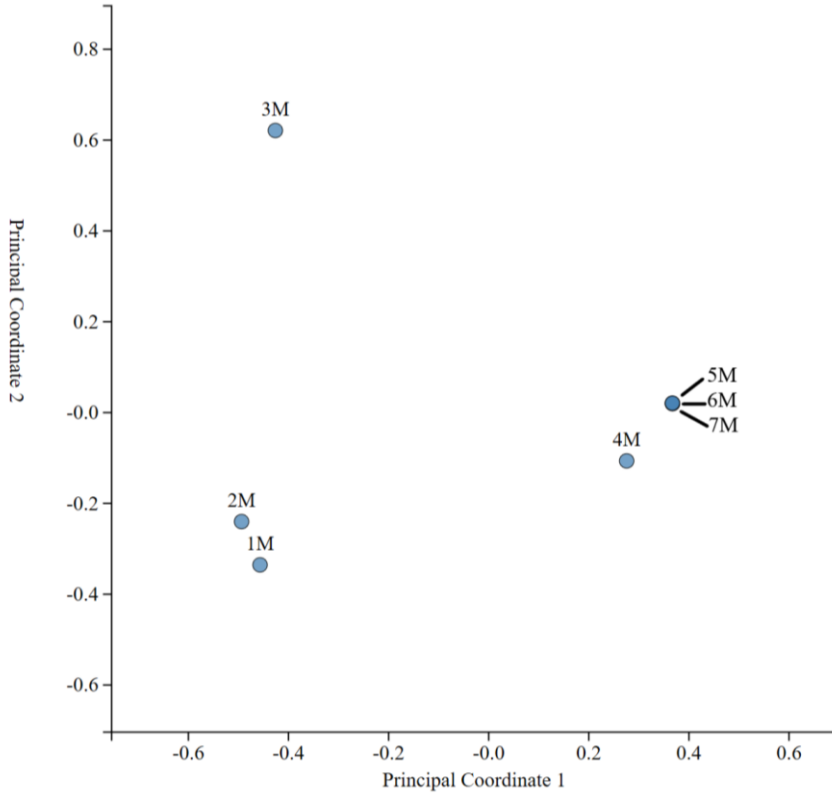
Table 1. Bacterial diversity values in DNA obtained from Boza samples directly and by pre-enrichment (Shannon species diversity index and number of identified species)

Örnek kodu	Örnek adı	Doğrudan Ekstraksiyon Sonrası		Ön zenginleştirme Sonrası	
		Shannon species diversity indeks	Tanımlanan tür sayısı	Shannon species diversity indeks	Tanımlanan tür sayısı
1	Mısır Unu	0.373	30	0.548	125
2	Buğday Unu	0.503	45	0.795	113
3	Mayşe	-	-	0.182	61
4	Boza 1. Gün	0.642	59	0.283	65
5	Boza mayası	0.711	70	0.154	50
6	Boza 3. Gün	0.918	124	0.228	66
7	Son Ürün Boza	0.664	61	0.187	48



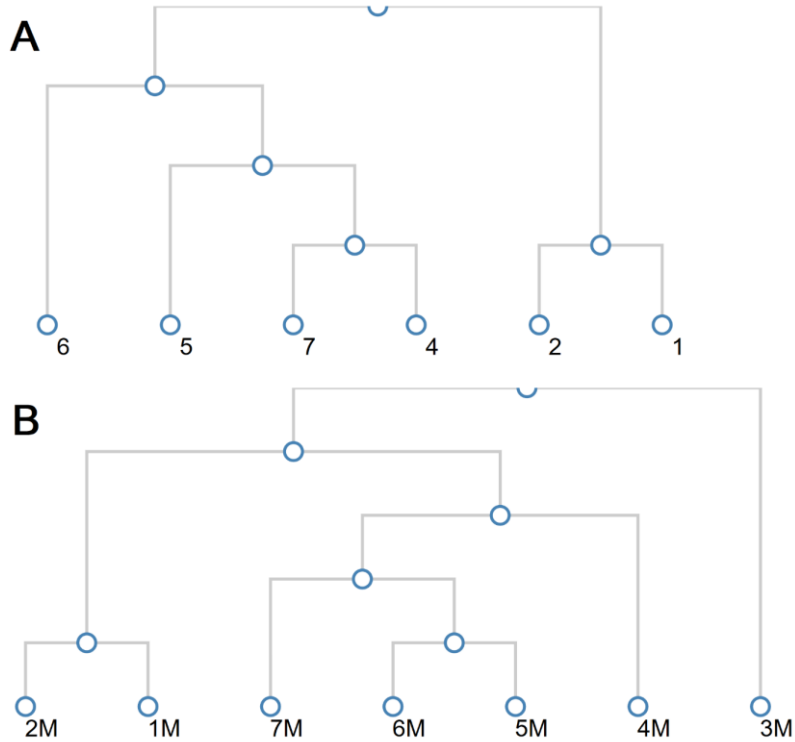
Şekil 3: Doğrudan örneklerden (1-7) elde edilen DNA kullanılarak yapılan sekans sonuçlarına göre cins düzeyinde PCoA analizi

Figure 3: Genus-level PCoA analysis according to sequence results using DNA directly obtained from the samples (1-7)



Şekil 4: Ön zenginleştirme yapılan örneklerden (1M-7M) elde edilen DNA kullanılarak yapılan sekans sonuçlarına göre cins düzeyinde PCoA analizi

Figure 4: Genus-level PCoA analysis according to sequence results using DNA obtained from pre-enriched samples (1M-7M)



Şekil 5: Dendrogram cins düzeyinde sekans sonucunda örnekler arasındaki homolojileri göstermektedir. A. Doğrudan örnekler (1-7) kullanılarak yapılan analiz sonucu, B. Ön zenginleştirmeye tabi tutulan örnekler (1M-7M) kullanılarak yapılan analiz sonucu

Figure 5: Dendrogram shows homologies between samples as a result of sequence at genus level. A. Result of analysis using directly samples (1-7) B. Result of analysis using samples applied to pre-enrichment (1M-7M)

SONUÇ

Boza dünyanın farklı coğrafyalarında farklı isim ve içerikleri ile tüketilen canlı bakteri içeriği ile fermente gıda statüsünde yer alan geleneksel bir içecektir. Kültürel yöntemler kullanılarak bozadan bakteri özellikle de LAB izolasyonu yapılan çalışmalarda baskın bakteri olarak *Lactobacillus* spp. karşımıza çıkmasına rağmen çalışmamızda son ürün boza örneğinde doğrudan örneklerden ekstraksiyonda *Lactobacillus* cinsi 4. sırada ve ön zenginleştirme yapılan son ürün örneğinde 2. sırada en çok tespit edilen cins türünde bakteri olmuştur. Yeni Nesil DNA Dizileme yönteminin bir örnek içerisindeki PZR ile çoğaltılan bakteriyel DNA bölgesinin yüksek sayıda okunması prensibine dayanması nedeniyle kültürel yöntemlere göre daha yüksek hassasiyet ve duyarlılığa sahip olduğu, bir örnek içerisinde hangi bakterilerin bulunduğu ve hangi oranlarda bulunduğunu ortaya çıkarmada önemli bir yöntem olduğu için çalışmamızda boza üretiminde kullanılan ham maddelerin mikrobiyotaya olan katkıları ve fermantasyon sürecinde mikrobiyotanın nasıl değiştiğinin belirlenmesinde bu yöntem tercih edilmiştir. Boza üretimi esnasındaki kaynatılma sonrasında ham madde olarak kullanılan mısır unu ve buğday ununda bulunan baskın bakterilerin son ürün boza içerisinde kaybolduğu gözlemlenmiş, boza mayasında bulunan baskın bakterilerin ise kendilerini muhafaza ederek ve fermantasyonu sağlayarak son ürün bozayı meydana getirdiği belirlenmiştir. Özellikle ön zenginleştirme sonrasında analiz edilen örneklerde, kullanılan ham maddelerde düşük oranda bulunan laktik asit bakterilerinin fermantasyon ile baskın hale geldikleri ve bozaya kendine has özellikleri sağladığı sonucuna varılmıştır.

Etik Kurul Bilgileri: Bu çalışma “Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik” Madde 8 (k) gereği HADYЕК iznine tabi değildir. Bu yazıda sunulan veri, bilgi ve belgeler akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde edilmiştir..

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir. Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Teşekkür: Çalışma kapsamında boza ve ham madde örneklerini sağlayan Sayın Mustafa Günnaz’a ve laboratuvar alt yapısının kullanıldığı Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi, Kit-ARGEM Araştırma Merkezi’ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Altay F, Karbancıoğlu-Güler F, Daskaya-Dikmen C, Heperkan D. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation

process and quality characteristics. *Int J Food Microbiol.* 2013; 167(1): 44-56.

Arici M, Daglioglu O. Boza: A lactic acid fermented cereal beverage as a traditional Turkish food. *Food Rev Int.* 2002; 18(1): 39-48.

Baschali A, Tsakalidou E, Kyriacou A, Karavasiloglou N, Matalas AL. Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: A neglected food group. *Nutr Res Rev.* 2017; 30(1): 1-24.

Bayat G, Yıldız G. The special fermented Turkish drink: Boza. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies* 2019; 7(4): 2438-2446.

Bliss ES, Whiteside E. The gut-brain axis, the human gut microbiota and their integration in the development of obesity. *Fron Physiol.* 2018; 9: 900.

Borcaklı M, Öztürk T, Yeşilada E. Cereal source and microbial consortia of the starter culture influence the chemical composition and physicochemical characteristics of boza. *Turk J Agric For.* 2018; 42: 412-422.

Botes A, Todorov SD, von Mollendorff JW, Botha A, Dicks LM. Identification of LAB and yeast from boza. *Process Biochem.* 2007; 42(2): 267-270.

Cholakov R, Tumbarski Y, Yanakieva V, Dobrev I, Salim Y, Denkova Z. Antimicrobial activity of *Leuconostoc lactis* strain BT17, isolated from a spontaneously fermented cereal beverage (Boza). *J Microbiol Biotech Food Sci.* 2017; 7(1): 47-49.

Çakır C. Tarihi, Etimolojisi ve Edebiyatı ile Boza Kitabı, Türk Dünyası Araştırmaları Vakfı Yayınevi, 1. Baskı, İstanbul. 2019; pp. 17-19.

De Vuyst L, Leroy F. Functional role of yeasts, lactic acid bacteria, and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiol Rev.* 2020; 44(4): 432-453.

Dogan M, Ozpinar H. Investigation of probiotic features of bacteria isolated from some food products. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2017; 23(4): 555-562.

Doğan M, Tekiner İH. Extracellular phytase activities of lactic acid bacteria in sourdough mix prepared from traditionally produced boza as starter culture. *Food and Health.* 2020; 6(2): 117-127.

Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017; 14(8): 491-502.

Gotcheva V, Pandiella SS, Angelov A, Roshkova ZG, Webb C. Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. *Process Biochem.* 2000; 36(1-2): 127-130.

Gotcheva V, Pandiella SS, Angelov A, Roshkova Z, Webb C. Monitoring the fermentation of the traditional Bulgarian beverage boza. *Int J Food Sci Tech.* 2001; 36: 129-134.

Hancıoğlu Ö, Karapinar M. Microflora of Boza, a traditional fermented Turkish beverage. *Int J Food Microbiol.* 1997; 35(3): 271-274.

Kıvanç M, Yılmaz M, Çakır E. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. *Turk J Biol.* 2011; 35(3): 313-324.

Levent H, Cavuldak ÖA. Geleneksel Fermente Bir İçecek: Boza. *Akademik Gıda.* 2017; 15(3): 300-307.

- Lindgren SW, Dobrogosz WJ.** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Rev.* 1990; 87: 149-164.
- Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML.** Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2004; 91(3): 297-304.
- Marco ML, Sanders ME, Gänzle M, Arrieta MC, Cotter PD, De Vuyst L, Hill C, Holzapfel W, Lebeer S, Merenstein D, Reid G, Wolfe BE, Hutkins R.** The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021.
- Osimani A, Garofalo C, Aquilant L, Milanović V, Clementi F.** Unpasteurised commercial boza as a source of microbial diversity. *Int J Food Microbiol.* 2015; 194: 62-70.
- Palamutoğlu Mİ, Baş M.** Traditional Fermented Foods of Turkey. *J Health Sci Res.* 2020; 2(3): 200-220.
- Rovella V, Rodia G, Di Daniele F, Cardillo C, Campia U, Noce A, Candi E, Della-Morte D, Tesauro M.** Association of gut hormones and microbiota with vascular dysfunction in obesity. *Nutrients.* 2021; 13(2): 613.
- Settanni CR, Ianiro G, Bibbò S, Cammarota G, Gasbarrini A.** Gut microbiota alteration and modulation in psychiatric disorders: Current evidence on fecal microbiota transplantation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2021; 109: 110258.
- Smith PA.** Brain, meet gut. *Nature.* 2015; 526: 312-314.
- Spichak S, Bastiaanssen TFS, Berding K, Vlckova K, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF.** Mining microbes for mental health: Determining the role of microbial metabolic pathways in human brain health and disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 2021; Mar 3:S0149-7634(21)00103-2.
- Sozbilen GS, Korel F, Yemenicioğlu A.** Control of lactic acid bacteria in fermented beverages using lysozyme and nisin: Test of traditional beverage boza as a model food system. *Int J Food Sci Tech.* 2018; 53(10): 2357-2368.
- Todorov SD, Dicks LM.** Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. *Braz J Microbiol.* 2007; 38(1): 166-172.
- Troyer EA, Kohn JN, Ecklu-Mensah G, Aleti G, Rosenberg DR, Hong S.** Searching for host immune-microbiome mechanisms in obsessive-compulsive disorder: A narrative literature review and future directions. *Neurosci Biobehav Rev.* 2021; Feb 24:S0149-7634(21)00094-4.
- Valledor SJD, Bucheli JEV, Holzapfel WH, Todorov SD.** Exploring beneficial properties of the bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* ST10Bz strain isolated from Boza, a Bulgarian cereal-based beverage. *Microorganisms.* 2020; 8: 1474.
- Wilkins AT, Reimer RA.** Obesity, early life gut microbiota, and antibiotics. *Microorganisms.* 2021; 9(2): 413.

Microbiological Profile of Top Caps of Drinks Offered for Sale in Tin Free Still (TFS) Can

Gökhan AKARCA^{1*}, İlknur GÜNEY¹

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

ABSTRACT

In this research, it was aimed to determine the microbial profile of the upper lids of various beverages offered for sale in TFS packages at markets, buffets, cafes and grocery stores etc. at different times. For this purpose, a total of 800 beverage samples were taken between October and June. Total aerobic mesophilic bacteria (TAMB), total yeast mold (TMK), total coliform group bacteria (TKGB) and *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* type bacteria were investigated. The highest TAMB number was 5.22 log cfu/cm² in cold tea group beverages, the highest TMK, TKGB numbers and *Staphylococcus aureus* species bacteria count were in the group of fruit flavored beverages, respectively 5.11 log cfu/cm², 4.21 log cfu/cm², and 3.37 log cfu / cm². has been determined. In addition, presence bacteria species, *Escherichia coli* in 35 samples, *Salmonella spp.* in 21 samples and *Listeria monocytogenes* 18 samples was detected.

Keywords: Can, Beverage, Contamination, Lid, Pathogen, TFS.

Tin Free Still (TFS) Ambalajlar İçerisinde Satışa Sunulan İçeceklerin Üst Kapaklarının Mikrobiyolojik Profili

ÖZ

Bu araştırmada marketlerde, büfelerde, kafelerde, vb. farklı zamanlarda satışa sunulan çeşitli içeceklerin üst kapaklarının mikrobiyal profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Ekim- Haziran ayları arasında toplam 800 adet içecek numunesi alınmıştır. Örneklerin toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB), toplam maya küf (TMK), toplam koliform grubu bakteri (TKGB) ve *Staphylococcus aureus* sayıları ile *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* ve *Listeria monocytogenes* türü bakteri varlıkları araştırılmıştır. En yüksek TAMB sayısı 5.22 log kob/cm² ile soğuk çay grubu içeceklerde, en yüksek TMK, TKGB sayıları ve *Staphylococcus aureus* türü bakteri sayısı sırasıyla 5.11 log kob/cm², 4.21 log kob/cm² ve 3.37 log kob/cm² meyve aromalı içecekler grubunda olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 35 örnekte *Escherichia coli*, 21 örnekte *Salmonella spp.* ve 18 örnekte de *Listeria monocytogenes* türü bakteri varlığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ambalaj, İçecek, Kapak, Kontaminasyon, Patojen, TFS.

To cite this article: Akarca G. Güney İ. Microbiological Profile of Top Caps of Drinks Offered for Sale in Tin Free Still (TFS) Can. Kocatepe Vet J. (2021) 14(2): 247-254.

Submission: 04.02.2021 Accepted: 26.04.2021 Published Online: 28.05.2021

ORCID ID; GA: 0000-0001-5761-7157, İE: 0000-0001-6835-3169

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

GİRİŞ

Ambalaj, içerisinde bulunan ürünü, ilk paketlendiği andaki mevcut yapısına ve şekline göre en iyi şekilde muhafaza eden, üretildiği halinde kalmasını sağlayan, kontaminasyonlardan koruyan, taşınmasını kolaylaştıran ve aynı zamanda ürünün tanıtımını yapan değerli bir malzemedir (Pektaş 1993).

Kalaylı teneke, kalınlığı 0,5 mm'den daha ince, düşük karbonlu (%0,1 den az C) yumuşak çelik levhaların her iki yüzeyinin belli oranda kalayla kaplanmasıyla üretilen materyallerdir. Gıda sanayinde kullanılanlar daha çok çelik levhanın özelliğine göre 0.10-0.30 mm kalınlıkta değişmektedir. Kutu üretiminde kullanılan teneke, çelik levhanın iki yüzünün de kalayla kaplanmasıyla elde edilmektedir (Üçüncü 2011).

Ambalaj çeşitleri gıdayı tozdan ve ürünü kontamine edebilecek topraktan korumalıdır. Böcek istilası metal, cam ya da bazı güçlü esnek filmlerle engellenebilir fakat yalnızca metal ve cam konteynırlar gıdayı kemirgen veya kuşlara karşı koruyabilirler (Tek 1997, Ecer ve Canitez 2004).

Mikroorganizmaların yüzeylere kontaminasyonu, direkt veya indirek (hava yolu vb.) temas yoluyla meydana gelmektedir. Bazı mikroorganizmalar ise; doğal ortamlara ve yapay ekosistemlere farklı faktörler etkisi sonucunda kolaylıkla yayılmakta ve hayatta kalabilen predominant formlar şeklinde yüzeylere tutunabilmektedirler (Larson ve ark. 1980, Lindsay ve von Holy 1999, Ayçiçek ve Küçükkaraslan 2003).

Yapılan çalışmalarda eller ve yüzeylerde, başta *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* gibi patojenler olmak üzere pek çok bakterinin günlerce hayatta kalabildikleri belirlenmiştir (Kusumaningrum ve ark. 2003).

Ambalajın, gıdaların daha uygun koşullarda muhafazası, tavsiye edilen tüketim zamanının arttırılması üreticiden tüketiciye kadar etkin ve güvenli taşınması, ürün kalite standartlarını mümkün olduğunca ilk günkü haliyle muhafaza edilmesi gibi önemli işlevleri bulunmaktadır (Keleş,1998).

Günümüzde yeni geliştirilen teknolojiler ambalajlar, içerisindeki gıdayı sadece dış kontaminatlardan korumakla kalmayıp, ambalaj içerisinde meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişiklikler ile mikrobiyal gelişmeyi de baskılayarak, gıdaların çok daha uzun süre ilk günkü koşullarını muhafaza etmesini sağlar durumdadır (Ayçiçek ve Küçükkaraslan 2003).

Ancak her ne kadar gelişmiş, kusursuz ambalaj malzemeleri kullanılırsa kullanılsın, ambalajlanmış gıdaların yüzeylerinde uygulanan prosesin farklı aşamalarından (üretim, depolama, taşıma, satışa sunma ve servis), iç-dış kaynaklı çevresel faktörlerden, haşere, kemirgen, kanatlılar ve diğer hayvanlardan, satış öncesi hijyenik olmayan koşullardaki ortamlardan, satış esnasında temizlik kurallarına yeterince ya da hiç riayet etmeyen satış personelinin

kaynaklı bulaşmalar meydana gelebilmektedir (Tayar 2018).

TFS ambalajlar içerisindeki içecekler büfe, kafe, market, bakkal, pastane vb. yerlerde satışa sunulmaktadır. Bu içecekler özellikle yaz aylarında piknik alanlarında, stadyumlarda, plajlarda, restoranlarda çok fazla miktarlarda tüketilmektedir. Tüketiciler bu tür içecekleri tüketmeden önce kapağın bulunduğu yüzeyin temizliğine genellikle dikkat etmemektedirler. Bu ambalajların en önemli özelliği kolay açılır bir kapak sistemine sahip olmasıdır. Kapağın üst kısmında yer alan halka yukarı doğru kaldırıldığında kapak kısmının bir bölümü yerinden ayrılarak ambalajın içerisine doğru açılmakta ve içeride bulunan içecek ile temas etmektedir. Ayrıca bu tür ambalajlar içerisindeki içecekler genelde pipet vb. araçlar kullanılmadan ya da bardağa dökülmeden direkt olarak ambalajından içilmektedir. Bu yüzden ambalajın yüzeyinde ve açma kapağında bulunan mikroorganizmalar ağız yolu ile vücuda girmektedir (Ayçiçek ve Küçükkaraslan 2003).

Bu çalışmada Afyonkarahisar ilinde market, büfe, kafe ve bakkal vb. yerlerde TFS ambalajlar içerisinde satışa sunulan çeşitli içeceklerin üst kapaklarının mikrobiyal profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Bu çalışmada alkolsüz gazlı içecekler (kola, meyve aromalı içecek ve gazoz grubu içecekler), enerji içecekleri, soğuk kahve, soğuk çay, meyve suları ve fermente alkollü içecekler olmak üzere ayrı ayrı sınıflandırılmıştır. Her bir sınıftan 100 farklı içecek numunesi Afyonkarahisar ilinde faaliyet gösteren 50 farklı satış noktasından (market, kafe, restoran ve büfe) Ekim -Haziran ayları arasında rastgele örnekleme metodu ile alınmıştır.

Örneklerin Hazırlanması

Örnek alınacak TFS ambalajın üst kısmına(kapağına) bir damla steril ringer çözeltisi damlatılmış, ardından steril swaplar (Fıratpen, Türkiye) yardımıyla sürüntü şeklinde örnek alımı gerçekleştirilmiştir. Örnekler alındıktan sonra swaplar içlerinde 10'ar mL steril % 0.1 tamponlanmış peptonlu su (Oxoid CM 0509), *Listeria enricment broth* (Oxoid, CM863+SR142) bulunan tüpler içerisine konulmuş ve soğuk zincir altında laboratuvara getirilerek analizleri aynı gün içerisinde yapılmıştır (Tomar ve Akarca 2019).

Mikrobiyolojik Analizler

Alınan örneklerin toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB), maya/küf (FMK), toplam koliform grup bakteri (TKGB), *Staphylococcus aureus* türü bakteri sayıları ile, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* ve *Listeria spp.* cinsi bakteri varlıkları yayma plak yöntemi kullanılarak araştırılmıştır (Halkman ve Sağdaş 2011). Ayrıca

swapların içerisinde konulduğu brotlardan 10-3'e kadar seri dilüsyonlar hazırlanmıştır (Anonim 2001, Sekin ve Karagözlü 2004).

TAMB sayısı; Plate Count Agar (PCA) (Merck 1.05463) kullanılarak yapılmıştır ve aerobik koşullarda 30°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır (ISO 2013a, ISO 2013b). TMK sayısı Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Merck 1.00467) (RBC) kullanılarak yapılmış ve aerobik koşullarda 22°C'de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır (ISO 2008). TKGB sayısı; Violet Red Bile Agar (Merck 1.01406) kullanılarak yapılmış ve aerobik koşullarda, 30°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır (ISO 1991). *Staphylococcus aureus* türü bakteri sayısı; Baird Parker Agar (Merck, 1.05406) ve Egg Yolk Tellurite Emülsiyon (Merck, 103785) karışımı kullanılarak yapılmıştır. Ekimi yapılan petri kutuları aerobik koşullarda, sırasıyla 30-35°C 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda gelişen şüpheli kolonilerden (etrafı beyaz zonlu, siyah koloniler) steril bir öze yardımıyla örnekler alınarak yeniden Baird Parker Agar ve Egg Yolk Tellurite Emülsiyon karışımına ekim yapılmış, aynı süre ve koşullarda bir kez daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda gelişen kolonilerden alınarak Bactident Coagulase (Merck 1.13306) ile koagülaz testi uygulanmış pozitif sonuç verenler *Staphylococcus aureus* olarak değerlendirilmiştir (ISO 1999).

Escherichia coli türü bakteri sayısı; Chromocult TBX Agar (Merck 1.16122) kullanılarak yapılmıştır. Ekimi yapılan petri kutuları aerobik koşullarda, 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında gelişen koloniler UV (366 nm) ışık altında kontrol edilmiştir (ISO 2001, ISO 2015).

Salmonella spp. cinsi bakteri sayımı için; 10 mL steril buffered pepton water içeren tüpler (BPW) (Oxoid, CM 0509) ve içerisindeki swaplarla birlikte, 24 saat boyunca 37 °C aerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben tüp içeriklerinden 0.1 mL steril otomatik bir pipet (Eppendorf, research plus) yardımıyla alınarak, 10 mL Rappaport Vassiliadis *Salmonella* Enrichment broth (RVS) (Merck, 107666) ve 10 mL steril Muller-Kauffmann tetrathionate / novobiocin broth (MKTTn) (Oxoid, CM 1048) içerisine aktarılmıştır. RVS ve MKTTn içeren tüpler sırasıyla 43 °C ve 37 ° C'de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyonun ardından, her iki tüpten de steril uçlu bir pipet yardımıyla 0.1 mL alınarak Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD) (Oxoid, CM 469) ve Brilliant Green agara (BGA) (Oxoid, CM 0329) aktarılmıştır. Steril bir drigalski (Orlab, Türkiye) yardımıyla homojen bir şekilde yayıldıktan sonra her iki agarda 37 °C'de 24 saat boyunca etüvde (Incucell, MMM, Almanya) inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra XLD agar üzerinde gelişen siyah merkezli ve pembe renkli koloniler ile BGA üzerinde gelişen pembe renkli ve şeffaf koloniler şüpheli kabul edilmiştir.

Bu kolonilerden en az 3'er tanesi steril bir öze yardımıyla alınarak Nutrient agara (Oxoid, CM 0003) geçilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir (ISO, 2002). Biyokimyasal testler için Nutrient agarda gelişen kolonilerden yine steril bir öze yardımıyla alınarak yatkı Triple sugar iron agar (TSIA) (Oxoid, CM 277) ve Lysine Iron Agar (LIA) (Oxoid, CM 381)'a geçilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Renk değişimi gösteren tüpler pozitif olarak kabul edilmiş ve bu koloniler biyokimyasal testlere tabi tutulmuşlardır (Flowers ve ark. 1992).

Biyokimyasal testlerde; IMViC (indol, metil kırmızısı, Voges-Proskauer, sitrat) testi, H₂S üretimi, üreaz testi, sitrat kullanımı, fermente etme yeteneği glikoz, laktoz, maltoz, arabinoz, sorbitol, mannitol ve dulcitol ve Gram boyama testleri tüm şüpheli kolonilere uygulanmıştır. Ayrıca şüpheli koloniler, *Salmonella* antiserum kullanarak (*Salmonella* O Poly A-1 ve Vi-Difco 2264-47-2) aglütinasyon için test edilmiş, aglütinasyon gösteren koloniler pozitif olarak kabul edilmiştir (ISO 2002).

İçerisinde 10 mL *Listeria* Enrichment Broth (LEB) (Oxoid, CM863+SR142) bulunan tüpler ve swaplar aerobik koşullar altında etüvde 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben, LEB içeriğinden 0.1 mL steril uçlu bir pipet yardımıyla alınarak, içinde 10 mL steril Fraiser Broth bulunan steril tüplere (Oxoid, CM895 + SR156) aktarılmış ve 35 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Ardından bu tüp içeriklerinden 0.1 mL yine steril uçlu bir pipet yardımıyla alınarak PALCAM Agar (Oxoid, CM 877 + SR150) ve Oxford Agara (Oxoid, CM 856 + SR140) inoküle edilmiş ve steril bir drigalski yardımıyla homojen bir şekilde yayılmıştır. Her iki besiyeri daha sonra aerobik koşullarda 30 °C'de 48 saat boyunca etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, *Listeria* türü olduğundan şüphelenilen ve her petri kabında gelişen kolonilerden en az 5'er tane steril bir öze ile alınarak biyokimyasal analizler için Trypticase Soy Yeast Agar (TSA-YE, Difco, 0370)'a transfer edilmiş ve 30 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra gelişen koloniler; Gram boyama, metil kırmızısı, Voges Proskauer reaksiyonu, nitrit indirgeme testlerine tabi tutulmuştur. Ayrıca katalaz ve oksidaz, hareketlilik ve beta hemoliz testleri de yapılmıştır. Katalaz ve oksidaz testleri için %3 H₂O₂, hareketlilik testi için SIM (Sulfide-Indole Motility) (Merck, 105470) ve beta hemoliz testi için de kanlı agar (Merck, 110886) kullanılmıştır (ISO 1996, Tomar ve Akarca 2019).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Afyonkarahisar ili şehir merkezinde TFS ambalajlar içerisinde satışı sunulan çeşitli içeceklerin üst kapaklarının TAMB sayıları Tablo 1'de belirtilmiştir. En düşük TAMB sayısının <1 log kob/cm² ile

fermente alkollü içecekler grubunda, en yüksek sayının ise; 5.22 log kob/cm² ile soğuk çaylar grubunda olduğu tespit edilmiştir. TAMB sayısının yüksek olması, içeceklerin üretildikten sonra ambalajlama, depolama, nakliye, satış öncesi ve satış

aşamalarında, hijyen ve sanitasyon kurallarına yeterince uyulmaması nedeniyle personel, hava, haşere, kemirgen, kuş vb. kaynaklı kontaminasyonlara uğramış olabileceklerini göstermektedir.

Tablo 1. TFS Ambalajlar içerisinde satışa sunulan içeceklerin üst kapaklarında tespit edilen toplam aerobik mezofilik bakteri sayıları (log kob/cm²)

Table 1. Total aerobic mesophilic bacteria count on the top lids of drinks offered for sale in TFS can (log cfu/cm²)

İçecek Türü	Numune Sayısı	Minimum	Maksimum	Ortalama ± Standart Sapma
Kola Grubu İçecekler	100	1.66	4.82	3.35±0.80
Meyve Aromalı İçecekler	100	1.38	5.03	3.76±1.02
Gazoz Grubu İçecekler	100	1.56	5.02	3.22±0.94
Enerji İçecekleri	100	<1	4.60	2.11±1.44
Soğuk Kahveler	100	1.27	3.75	2.49±1.39
Soğuk Çaylar	100	1.14	5.22	2.90±1.13
Meyve Suları	100	<1	5.04	2.83±1.81
Fermente Alkollü İçecekler	100	<1	4.62	2.35±1.63

Sekiz farklı içecek grubundan alınan örnekler için en düşük TMK sayıları <1-5.11 log kob/cm² arasında değiştiği belirlenmiştir. Fermente alkollü içecekler grubu en düşük, meyve aromalı içecekler grubu ise en

yüksek TMK sayısına sahiptir (Tablo 2). TMK sayılarının bu denli yüksek oranda tespit edilmesi, çevresel kaynaklı bulaşmanın yüksek boyutlarda olduğunu, özellikle depolama alanlarının hijyenik kalitesinin düşük olduğuna işaret etmektedir.

Tablo 2. TFS Ambalajlar içerisinde satışa sunulan içeceklerin üst kapaklarında tespit edilen toplam maya/küf sayıları (log kob/cm²)

Table 2. Total yeast / mold count detected on the top lids of drinks offered for sale in TFS Can (log cfu/cm²)

İçecek Türü	Numune Sayısı	Minimum	Maksimum	Ortalama ± Standart Sapma
Kola Grubu İçecekler	100	1.85	4.48	3.07±1.64
Meyve Aromalı İçecekler	100	1.21	5.11	3.14±1.75
Gazoz Grubu İçecekler	100	1.09	4.97	3.60±2.22
Enerji İçecekleri	100	1.14	4.60	2.99±1.43
Soğuk Kahveler	100	1.15	3.71	2.32±1.28
Soğuk Çaylar	100	1.10	3.53	1.93±1.16
Meyve Suları	100	1.14	4.49	3.63±1.42
Fermente Alkollü İçecekler	100	<1	4.61	2.80±1.84

İçeceklerin üst kapaklarının TKGB sayıları Tablo 3'te, *Staphylococcus aureus* türü bakteri sayıları ise Tablo 4'de gösterilmiştir. Örnek grupları arasında en düşük TKGB ve *Staphylococcus aureus* türü bakteri sayıları <1 log kob/cm² ile fermente alkollü içecekler grubunda, en yüksek sayılar ise, TKGB sayısı için 5.21 log kob/cm² ve *Staphylococcus aureus* türü bakteri sayısı için ise 3.37 log kob/cm² ile meyve aromalı içecekler grubunda olduğu belirlenmiştir. Koliform grubu bakteriler *Enterobacteriaceae* familyasından, gram

negatif, fakültatif anaerob, bağırsak kökenli mikroorganizmalardır. Bu bakteriler özellikle gıda ve suların mikrobiyolojik kalitelerinin belirlenmesinde kullanılan indikatör bakteriler arasındadır. Sayılarının fazla olması ürünlerin üretiminde uygulanan hijyen ve sanitasyon kurallarının yetersizliğinin ve/veya üretim sonrası oluşan kontaminasyonların ve dışkı bulaşmasının göstergesi olarak kabul edilmektedir (Ünlütürk ve Turantaş, 2003).

Tablo 3. TFS Ambalajlar içerisinde satışı sunulan içeceklerin üst kapaklarında tespit edilen toplam koliform grubu bakteri sayıları (log kob/cm²)

Table 3. Total coliform group bacteria counts detected on the top lids of drinks offered for sale in TFS can (log cfu/cm²)

İçecek Türü	Numune Sayısı	Minimum	Maksimum	Ortalama ± Standart Sapma
Kola Grubu İçecekler	100	<1	2.53	0.64±1.04
Meyve Aromalı İçecekler	100	<1	4.21	0.92±1.09
Gazoz Grubu İçecekler	100	<1	4.14	1.04±1.36
Enerji İçecekleri	100	<1	3.71	0.75±1.41
Soğuk Kahveler	100	<1	3.27	0.81±1.03
Soğuk Çaylar	100	<1	2.88	0.50±1.11
Meyve Suları	100	<1	3.14	1.01±0.28
Fermente Alkollü İçecekler	100	<1	2.07	0.61±1.33

Staphylococcus aureus yetişkin ve sağlıklı kişilerin %35-40'ının asemptomatik olarak taşıdığı dış ortam şartlarına uzun süre dayanıklı, havada ve cansız objelerde uzun süre canlı kalabildiği belirtilen bir bakteridir. İnsanların %50 den fazlasının burun boşluğunda ve boğazlarında ayrıca vücut yaralarında

bulunur. Bu bakteriye ambalajlarda rastlanması özellikle ambalajlama ve sonrasında aşamalarda insan kaynaklı kontaminasyonlara işaret etmektedir. (Gönç ve ark 1998, Ünlütürk ve Turantaş 2003, Çon ve ark 2004).

Tablo 4. TFS Ambalajlar içerisinde satışı sunulan içeceklerin üst kapaklarında tespit edilen *Staphylococcus aureus* türü bakteri sayıları (log kob/cm²)

Table 4. The count of *Staphylococcus aureus* bacteria detected on the top lids of drinks offered for sale in TFS can (log cfu/cm²)

İçecek Türü	Numune Sayısı	Minimum	Maksimum	Ortalama ± Standart Sapma
Kola Grubu İçecekler	100	<1	3.36	0.53±0.82
Meyve Aromalı İçecekler	100	<1	3.37	0.67±0.71
Gazoz Grubu İçecekler	100	<1	3.15	0.71±0.85
Enerji İçecekleri	100	<1	2.09	0.39±0.53
Soğuk Kahveler	100	<1	2.50	0.43±0.80
Soğuk Çaylar	100	<1	2.39	0.63±0.88
Meyve Suları	100	<1		0.84±0.55
Fermente Alkollü İçecekler	100	<1	1.79	0.26±0.56

TFS tenekeler içerisinde satışı sunulan içeceklerin üst kapaklarında gıda kaynaklı patojen bakteri varlıkları; *Escherichia coli* Tablo 5, *Salmonella spp.* Tablo 6 ve *Listeria monocytogenes* ise Tablo 7'de gösterilmiştir. Alınan toplam 800 adet numunenin 35 adedinde *Escherichia coli*, 21 adedinde *Salmonella spp.* ve 18

adedinde ise *Listeria monocytogenes* türü bakteri varlığı tespit edilmiştir. Örnek grupları arasında en fazla *Escherichia coli* varlığı %12 ile meyve aromalı içecekler grubunda, en fazla *Salmonella spp.* ve *Listeria monocytogenes* türü bakteri varlıkları ise %5 ile gazoz grubu içeceklerde olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 5. TFS Ambalajlar içerisinde satışı sunulan içeceklerin üst kapaklarında tespit edilen *Escherichia coli* türü bakteri varlığı

Table 5. The presence of *Escherichia coli* species bacteria detected on the top lids of drinks offered for sale in TFS can

İçecek Türü	Numune Sayısı	Üreme Gözlenen Numune Sayısı	%
Kola Grubu İçecekler	100	7	7
Meyve Aromalı İçecekler	100	8	8
Gazoz Grubu İçecekler	100	12	12
Enerji İçecekleri	100	-	-
Soğuk Kahveler	100	-	-
Soğuk Çaylar	100	1	1
Meyve Suları	100	4	4
Fermente Alkollü İçecekler	100	3	3

Tablo 6. TFS Ambalajlar içerisinde satışı sunulan içeceklerin üst kapaklarında tespit edilen *Salmonella spp.* bakteri varlığı

Table 6. The presence of *Salmonella spp.* bacteria detected on the top lids of drinks offered for sale in TFS can

İçecek Türü	Numune Sayısı	Üreme Gözlenen Numune Sayısı	%
Kola Grubu İçecekler	100	3	3
Meyve Aromalı İçecekler	100	2	2
Gazoz Grubu İçecekler	100	5	5
Enerji İçecekleri	100	-	-
Soğuk Kahveler	100	2	2
Soğuk Çaylar	100	4	4
Meyve Suları	100	3	3
Fermente Alkollü İçecekler	100	2	2

Tablo 7. TFS Ambalajlar içerisinde satışı sunulan içeceklerin üst kapaklarında tespit edilen *Listeria monocytogenes* türü bakteri varlığı

Table 7. The presence of *Listeria monocytogenes* species bacteria detected on the top lids of drinks offered for sale in TFS can

İçecek Türü	Numune Sayısı	Üreme Gözlenen Numune Sayısı	%
Kola Grubu İçecekler	100	4	4
Meyve Aromalı İçecekler	100	1	1
Gazoz Grubu İçecekler	100	5	5
Enerji İçecekleri	100	-	-
Soğuk Kahveler	100	-	-
Soğuk Çaylar	100	2	2
Meyve Suları	100	4	4
Fermente Alkollü İçecekler	100	2	2

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğinde pek çok gıda maddesinde bulunabilecek maksimum *Salmonella spp.* ve *Listeria monocytogenes* sayılarını “0” olarak belirtilmiştir (Anonim 2009). Ambalaj kapaklarının sonuçları bu kriter baz alınarak değerlendirildiğinde, 39 adet içecek kapağının mikrobiyolojik profili bu kritere uymamaktadır.

Araştırmamız sonuçlarına benzer şekilde, Ayçiçek ve ark. (2003) TFS meşrubat kutularının üst yüzeylerinin mikrobiyal profillerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 127 adet meşrubat kutusunun %21.2’sinde *Staphylococcus aureus*, %16.5’inde maya ve küf ve %7.8’inde *Escherichia coli* tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada özellikle TFS ambalaj içerisinde satışa sunulan fermente alkollü içeceklerin üst yüzeyinde bulunan koruma kapağının altından aldığımız numunelerde tespit edilen sayılar (TAMB, TMK, TKGB ve *Staphylococcus aureus*) diğer örnek gruplarına kıyasla daha düşük olarak tespit edilmesine karşın, bu sayıların yüksekliği ile *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* *Escherichia coli* türlerine ait bakteri varlıkları, ambalajın üst kısmını koruma amaçlı olarak kapatılan alüminyum üst kapağın, amacına tam olarak ulaşmadığını göstermektedir. Ayrıca alınan numunelerde tespit edilen sayılar ve bakteri varlıkları, bulaşmanın sadece depolama kaynaklı olmadığını, üretim esnasında da kontaminasyonların olduğunu göstermiştir. Bu sonuç üretim esnasında hijyen ve sanitasyon kurallarına yeterince uyulmadığının da göstergesidir.

SONUÇ

Bu çalışmada market, büfe, kafe ve bakkal vb. yerlerde TFS ambalajlar içerisinde satışa sunulan çeşitli içeceklerin üst kapaklarının mikrobiyal kalitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Analizler sonucunda TFS kutuların üst yüzeyinde insan ve çevresel kaynaklı çeşitli mikroorganizmalar ile patojen bakterilerin varlığı tespit edilmiştir.

Elde edilen veriler, kontaminasyonların üretim, ambalajlama, depolama, nakliye, satış öncesi ve satış esnasında, insan, çevre, böcek, kemirgen, kuş vb. kaynaklı olduğu göstermektedir. Ayrıca ambalajların üretimden satışa kadar geçen sürede maruz kaldıkları koşulların hijyenik açıdan son derece zayıf olduğunu, depolama, nakliye ve satış aşamalarında çalışan personelin hijyen ve sanitasyon kurallarına gerektiği kadar riayet etmediğini de ortaya koymuştur.

Bu nedenlerle; ham madde, üretim, depolama, nakliye ve satış yerlerinde çalışan tüm personele temel hijyen ve sanitasyon kuralları konusunda eğitimler verilmesi ve konunun önemini çalışanlar tarafından algılanması sağlanmalıdır. Tüm işletmelerde ham maddeden depolamaya kadar bütün proses aşamalarında HACCP (Hazard Analysis And Critical Control Point) sistemiyle, iyi üretim uygulama

tekniklerinin GMP (Good Manufacture Practise) kurulması gerekmektedir. Haşere, kemirgen ve kuş kontaminasyonlarına karşı önlemler alınmalı, düzenli bir temizlik planlaması yapılarak bu sayede olası muhtemel kontaminasyonların da azaltması gerekmektedir.

Ayrıca konu ile ilgili olarak Türk Gıda Kodeksi ambalajlama ve mikrobiyolojik kriterler yönetmelikleri kapsamında ilgili çalışmalar yapılması da öngörülmektedir.

Etik Kurul Bilgileri: Bu çalışma “Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik” Madde 8 (k) gereği HADYEK iznine tabi değildir. Bu yazıda sunulan veri, bilgi ve belgeler akademik ve etik kurullar çerçevesinde elde edilmiştir.

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

KAYNAKLAR

- Evaluation Anonim.** Türk Gıda Kodeksi, Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Ankara. 2009
- Anonim.** Türk Standartları Enstitüsü, TS 6235 EN ISO 6887-1. Gıda ve Hayvan Yemleri Mikrobiyolojisi, Deneysel Numunelerinin Başlangıç Süspansiyonunun ve Ondalık Seyreltilerinin Hazırlanması İçin Genel Kurallar. 2001.
- Ayçiçek H, Küçükaraaslan A.** Metal Meşrubat kutu dış yüzeylerinin mikrobiyal profili. YYÜ. Veteriner Fakültesi Dergisi 2003; 14 (1):118-123.
- Çon AH, Kanbakan U, Ayar A.** Determination of Microbiological Contamination Sources During Ice Cream production in Denizli, Turkey. Food Control. 2004; 15:463-470.
- Ecer F, Canitez M.** Uluslararası Pazarlama. Gazi Kitabevi, Ankara. 2005
- Flowers RS, D’aust JY, Andrews WH, Bailey JS.** Salmonella. In Vanderzant C, Spiltstoesser DF. (Eds.). Compendium of the Methods for the Microbiological Examinations of Foods. American Public Health Association, Washington, USA. 1992. pp.371-422.
- Gönc S, Kınık Ö, Akalın S. (Eds).** Çiğ Sütte Patojen Mikroorganizmalar. Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF) Yayını. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları:527. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir.1998.
- Halkman K., Sağdaz ÖE.** Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Prosigma Basım ve Promosyon Hizmetleri, Ankara. 2011.
- ISO. International Standard Organization. 11290. 1,2:** Horizontal Method for the Detection of *Listeria monocytogenes*. Switzerland. 1996.
- ISO. International Standard Organization, 4833-2:2013.** Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms, Part 2: Colony Count at 30 Degrees C by the Surface Plating Technique. Geneva, Switzerland. 2013

- ISO. International Standard Organization. 16649-1:2001.** Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs, Horizontal Method for the Enumeration of Beta Glucuronidase Positive *Escherichia coli*. Part 1: Colony Count Technique at 44 Degrees C Using Membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. Geneva, Switzerland. 2001.
- ISO. International Standard Organization. 16649-3:2015.** Microbiology of the Food Chain, Horizontal Method for the Enumeration of Beta-Glucuronidase-Positive *Escherichia coli*. Part 3: Detection and Most Probable Number Technique Using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide. Geneva, Switzerland. 2015.
- ISO. International Standard Organization. 21527-1:2008.** Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs, Horizontal Method for the Enumeration of Yeasts and Moulds, Part 1: Colony Count Technique in Products with Water Activity Greater Than 0,95. Geneva, Switzerland. 2008
- ISO. International Standard Organization. 4832.** General Guidance for the Enumeration of Coliforms Colony Count Technique. Geneva, Switzerland. 1991.
- ISO. International Standard Organization. 4833-1:2013.** Microbiology of the Food Chain, Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms, Part 1: Colony Count at 30 degrees C by the Pour Plate Technique. Geneva, Switzerland. 2013.
- ISO. International Standard Organization. 6579- 1.** Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for the Detection of *Salmonella spp.* Switzerland. 2002.
- ISO. International Standard Organization. 6888-1.** Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase Positive Staphylococci Technique Using Baird Parker Agar Medium. Geneva, Switzerland.1999.
- Keleş F.** Gıda ambalajlama İlkeleri, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları No:180, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisleri, Erzurum. 1998.
- Kusumaningrum HD, Riboldi G, Hazeleger WC, Beumer RR.** Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to food. Int.J.Food Microbiol. 2003; 85(3): 227-36.
- Larson EL, Strom MS, Evans CA.** Analysis of three variables in sampling solutions used to assay bacteria of hands: Type of solution, use of antiseptic neutralizers, and solution temperature. Journal Clinical Microbiology 1980; 12: 255-260.
- Lindsay D, von Holy A.** Different responses of planktonic and attached *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* to sanitizer treatment. Journal of Food Protection 1999; 62: 368-379.
- Pektaş H.** Ambalaj Tasarımının Önemi.Ekonomik ve Teknik Dergi. 1993; 376: 24 - 25.
- Sekin Y, Karagözlü N.** Gıda Mikrobiyolojisi. Gıda Endüstrisinde Temel İlkeler ve Uygulamalar. Literatür Yayınevi, İstanbul. 2004.
- Tayar, M.** Hijyen ve Sanitasyon. Bursa Uludağ Üniversitesi, Karacabey Meslek Yüksek Okulu Ders Notları, Uludağ Üniversitesi Yayınları, Bursa. 2018.
- Tek ÖB.** Pazarlama İlkeler Global Yönetimsel Yaklaşım Türkiye Uygulamaları. (Geliştirilmiş Yedinci Baskı). Beta Yayınları.İstanbul.1997
- Tomar O, Akarca G.** Critical control points and food pathogen presence in dairy plants from Turkey. Food Science and

Technology Campinas, 2019; 39(2): 444-450, DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.29717>

- Üçüncü M.** Gıdaların ambalajlanma Teknolojisi. Ambalaj Sanayicileri Derneği, İktisadi İşletmesi, İstanbul. 2011.
- Ünlütürk A, Turantaş F. (Eds).** Gıda Mikrobiyolojisi. (3.Baskı). Ege Üniversitesi, Ege Meslek Yüksekokulu. Ege Üniversitesi, Bornova, İzmir. 2003.

A Histochemical and Immunohistochemical Study on Glandula Mandibularis Mast Cells in Angora Goat

Tuğrul Ertuğrul*

¹Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology and Embryology, Samsun, Turkey

ABSTRACT

Mast cells are particularly in association with structures, especially the skin, respiratory, and digestive systems in proximity to surfaces that interface with the external environment. This study was carry out to demonstrate the distribution and heterogeneity of mast cells in the Angora goat glandula mandibularis by using morphological, histochemical, and immunohistochemical methods. A total of seven healthy male adult Angora goats' mandibular glands were studied. Mast cells were distinctly distinguished by their metachromatic staining in preparates stained with toluidine blue. The cells were observed in various sizes and shapes, especially round, oval, and elongate-shaped. Mast cells were seen in both intralobular and interlobular interstitium in glandula mandibularis. Many mast cells were observed in the interlobular interstitium, especially around the blood vessels. The Alcian-blue/Safranin O combined staining method was used to determine mast cell heterogeneity. In glandula mandibularis, blue-colored alcian-blue (AB) (+) and pink-red colored safranin O (SO) (+) mast cell subtypes were observed. Chymase positive mast cells were usually observed one by one in both intralobular and interlobular interstitium. As a result, the mandibular gland of Angora goat which is local species was examined; the morphology, locations, heterogeneity of mast cells, and chymase expression were specified.

Key Words: Angora goat, chymase, glandula mandibularis, mast cell

Ankara Keçisinde Glandula Mandibularis Mast Hücreleri Üzerine Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Bir Çalışma

ÖZ

Mast hücreleri genellikle dış çevre ile arayüz oluşturan yüzeylere yakın yapılarla, özellikle deri, solunum ve sindirim sistemleri ile ilişkilidir. Bu çalışma, Ankara keçisi glandula mandibularisinde mast hücrelerinin dağılımını ve heterojenliğini morfolojik, histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle göstermek amacıyla yapılmıştır. Toplam yedi adet yetişkin sağlıklı erkek Ankara keçisinin glandula mandibularisi incelenmiştir. Toluidin mavisi ile boyanan kesitlerde, mast hücreleri, metakromatik boyanmaları ile belirgin bir şekilde ayırt edildi. Hücreler, özellikle yuvarlak, oval ve iğ şeklinde olmak üzere çeşitli boyut ve şekillerde gözlemlendi. Mast hücreleri glandula mandibularis'de hem intralobuler hem de interlobular interstisyumda görüldü. İnterlobüler interstisyumda, özellikle kan damarlarının çevresinde birçok mast hücresi gözlemlendi. Mast hücre heterojenliğini belirlemek için Alcian-blue / Safranin O kombine boyama yöntemi kullanıldı. Glandula mandibularis'te mavi renkli alcian-blue (AB) (+) ve pembe-kırmızı renkli safranin O (SO) (+) mast hücre alt tipleri görüldü. Kimaz pozitif mast hücreleri genellikle tek tek hem intralobüler hem de interlobüler intersitisyumda gözlemlendi. Sonuç olarak, yerel bir tür olan Ankara keçisinin glandula mandibularisi incelenerek; mast hücrelerinin morfolojisi, konumu, heterojenitesi ve kimaz ekspresyonu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Ankara keçisi, glandula mandibularis, kimaz, mast hücre

To cite this article: Ertuğrul T. A Histochemical and Immunohistochemical Study on Glandula Mandibularis Mast Cells in Angora Goat. Kocatepe Vet J. (2021) 14(2):255-261

Submission: 19.03.2021 Accepted: 24.05.2021 Published Online: 30.05.2021

ORCID ID; TE: 0000-0002-9310-1200

*Corresponding author e-mail: tugrulertugrul06@hotmail.com

INTRODUCTION

Mast cells can be round, oval, or elongate in shape depending on their location (Chen et al. 1990), and their size varies depending on the tissue in which they are located (Ertuğrul and Kurtdede, 2017). In their cytoplasm, they have several round shape and varying in size secretion granules. Mast cells have a large, polymorphic, round, or oval-shaped nucleus in the center of the cell (Eurell and Frappier, 2006). The granules found in their cytoplasm are collected in two main groups, the substances previously synthesized and stored in the granules and substances synthesized after stimulation (Ross and Pawlina, 2016). Mast cells are particularly associated with structures close to surfaces that interface with the external environment, such as the skin, respiratory, and digestive systems (Krystel-Whittemore et al. 2016). Mast cells can function as antigen-presenting cells by processing antigens (Galli et al. 1999), and they play a key role in immune response development (Echtenacher et al. 1996), as well as innate and adaptive host immune responses to pathogens (Urb and Sheppard, 2012).

Due to granules in their cytoplasm, mast cells show metachromasia when stained with toluidine blue (Bancroft and Gamble, 2002). Mast cells were divided into two subtypes based on their physiological characteristics, staining characteristics, functional variety, mediators they contain, and responses to foreign matter release (Lin and Befus, 2002). Mucosal mast cells (MMC) and connective tissue mast cells (CTMC) are two subtypes of mast cells (Enerback, 1966). When dyed with granule-specific dyes including alcian blue and safranin O, MMC is dyed with alcian blue, while CTMC is dyed with safranin O (Chen et al. 1990). Serine proteases, biogenic amines, and chemokines are among the biologically active compounds produced and secreted by mast cells (Pejler et al. 2010). According to the distribution pattern of neutral proteases, mast cells are immunohistochemically divided into two subgroups: tryptase-positive (MC_T) and chymase-positive mast cells (MC_{TC}) (Irani and Schwarz, 1994). The acidic activation dipeptide of mast cell chymase is similar to most serine proteases found in the granule (Wolters et al. 2001). Chymase can inactivate neuropeptides and is involved in immune response (Caughey, 2007), inflammation, allergy, and angiogenesis processes (Atiakshin et al. 2019).

This study aimed to investigate the distribution and heterogeneity of mast cells in the Angora goat glandula mandibularis using histochemical and immunohistochemical methods.

MATERIAL and METHODS

Tissue samples from the mandibular glands of seven adult and healthy male Angora goats obtained from slaughterhouses in and around Ankara were used in

the study. Glandula mandibularis tissue samples were fixed in a 10% formaldehyde solution for 24 hours. The tissues were held for 1 hour in each of 70 percent, 80 percent, and 96 percent alcohol after being stored in a running water bath for 24 hours to remove the formalin. This was followed by three 1 hour applications of absolute alcohol and xylol were done. The tissue samples were then blocked in paraffin.

Histochemistry

From the prepared blocks, 5 µm thick sections were taken and stained with toluidine blue (0.5%, pH 0.5) prepared in McIlvaine's citric acid disodium phosphate buffer to show the mast cells for 10 minutes (Enerback, 1966). Also, sections taken from blocks were stained in 0.2 M acetate buffer alcian blue (0.5%, pH 0.2) /safranin O (0.25%, pH 1.42) combined dyes to determine the subtypes of mast cells and their distributions in tissues (Bancroft and Cook, 1984).

Following the staining alcian blue/safranin O combined method, the number of AB (+) and SO (+) mast cells in 1mm² was evaluated semi-quantitatively as (+), (++) and (+++).

Immunohistochemistry

Anti-rabbit polyclonal chymase (1/200 dilution, Biorbyt, orb11030) primary antibody was used to stain 5 m thick mandibular gland sections taken from paraffin blocks using the Streptavidin biotin complex method (True, 1990). Histostain Plus (Zymed kit: 85-6743) kit was used as the secondary antibody. After deparaffinization, sections were heated in a microwave oven of 700 watts within citrate buffer (pH 6) solution for antigen retrieval. In order to block endogenous peroxidase activity, the tissues were incubated in a 3% hydrogen peroxide solution. Following washing with phosphate buffer solution (PBS), serum in the kit was instilled to prevent nonspecific protein binding in sections. Primary antibody was applied to sections and they were stored at +4 °C overnight. Only PBS solution was instilled on negative control group tissues. Following the washing procedure, biotinylated secondary antibody was instilled into sections and incubated at streptavidin-horseradish peroxidase complex after washing. In the last stage, 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) was used as chromogen, and counterstaining was performed with hematoxylin.

RESULTS

Histochemical Findings

Toluidine Blue Staining

Mast cells were easily distinguished in light-microscopic examinations of tissue cross-sections taken from the glandula mandibularis of the Angora goat due to metachromasia. The cells were observed

in a variety of sizes and shapes, particularly round, oval, and elongate-shaped. Mast cell nuclei were found to be centrally and eccentrically located and were covered by granules in the most of cells. Mast cell granules could not be identified one by one in the majority of the sections examined because the cells' cytoplasm was homogeneously stained. Mast cells were found in the glandula mandibularis' intralobular and interlobular interstitium. Mast cells were seen more in the interlobular interstitium. Mast cells were found in dense clusters around salivary secretory ducts. Many mast cells were observed in the connective tissue between the lobes, particularly around the blood vessels (Fig. 1).

AB/SO Combine Staining

In the glandula mandibularis, blue color AB (+) and pink-red color SO (+) mast cells were identified using the AB/SO staining method to determine mast cell heterogeneity. AB (+) and SO (+) were found to be round and elongate-shaped. AB (+) and SO (+) cells were observed in the glandula mandibularis, close to the salivary ducts, in both the intralobular and

interlobular interstitium (Fig. 2). It was seen that mast cells stained SO (+) in the glandula mandibularis were more than AB (+) stained mast cells (Table 1).

Immunohistochemical Findings

Chymase-Positive Mast Cell

Chymase-positive mast cells with oval and round shapes were found in the glandula mandibularis. MC_{TCS} were observed one by one in both intralobular and interlobular interstitial spaces. MC_{TCS} in the mandibular gland were seen around the vessels and in the connective tissue septa covering the salivary secretory ducts. Also, MC_{TCS} were observed to be mostly located near the glands (Fig. 3).

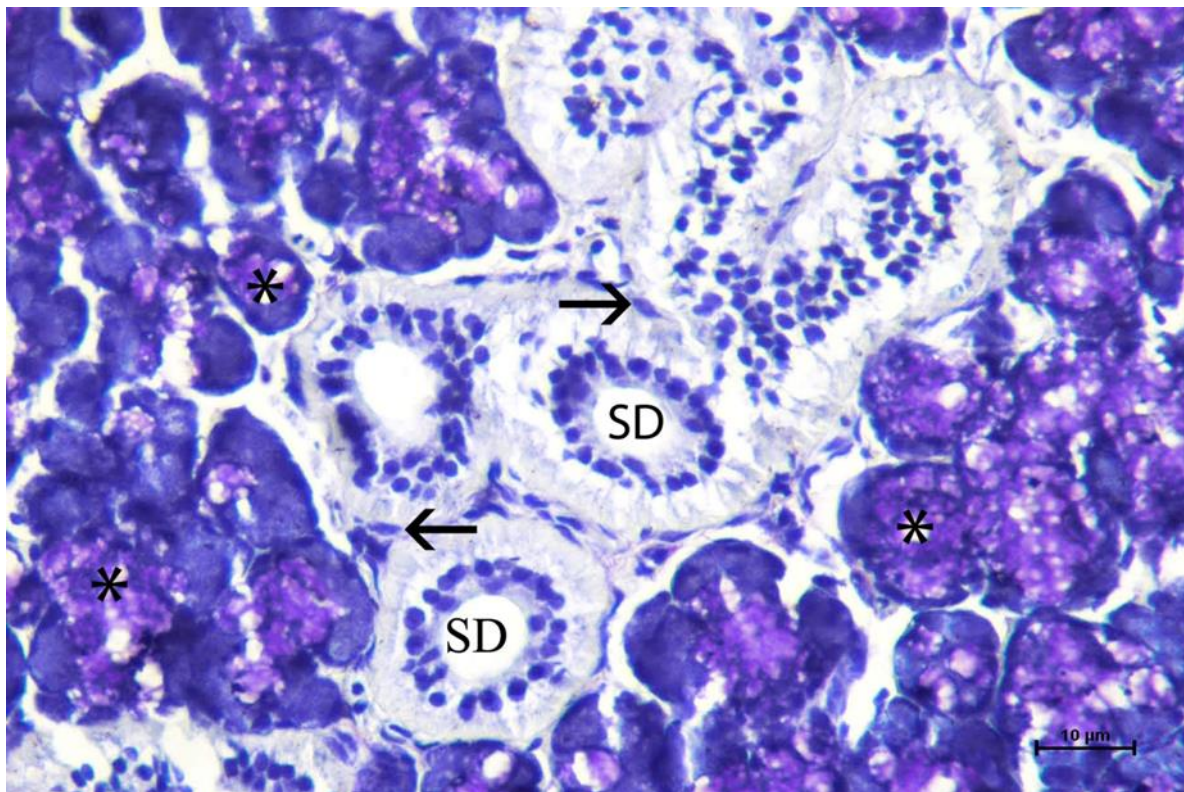


Figure 1: Toluidine blue staining; arrow: metachromatic mast cells, glandula (asterisk), secretory ducts (SD), original magnification X40; range bar, 10 µm.

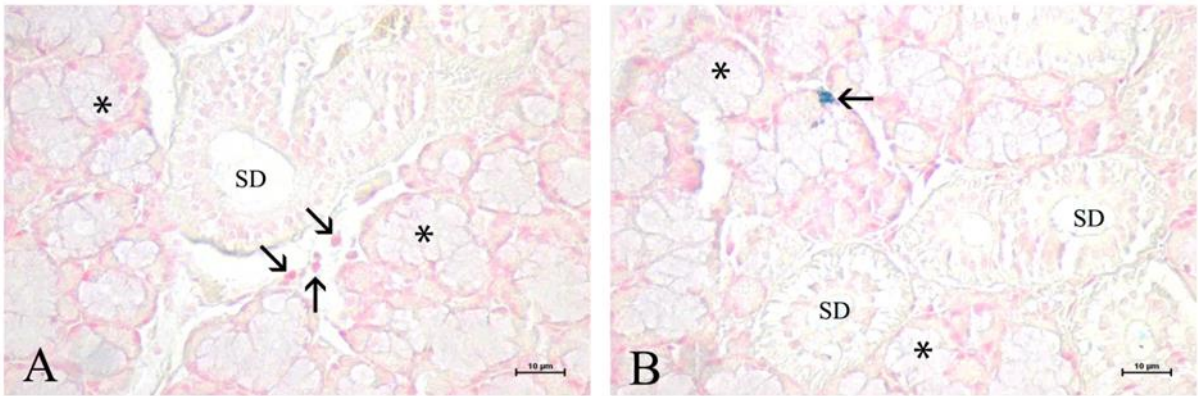


Figure 2: Alcian blue/safranin O combined staining method; A, arrow: SO (+) mast cell, glandula (asterisk), secretory ducts (SD), B, arrow: AB (+) mast cell, glandula (asterisk), secretory ducts (SD), original magnification X40; range bar, 10 µm.

Table 1. The density of AB (+) and SO (+) mast cells in glandula mandibularis (alcian blue/safranin O combined method, semi-quantitatively evaluating (+), (++) and (+++)).

Mast cell	Density
Alcian blue (+)	(+)
Safranin O (+)	(++)

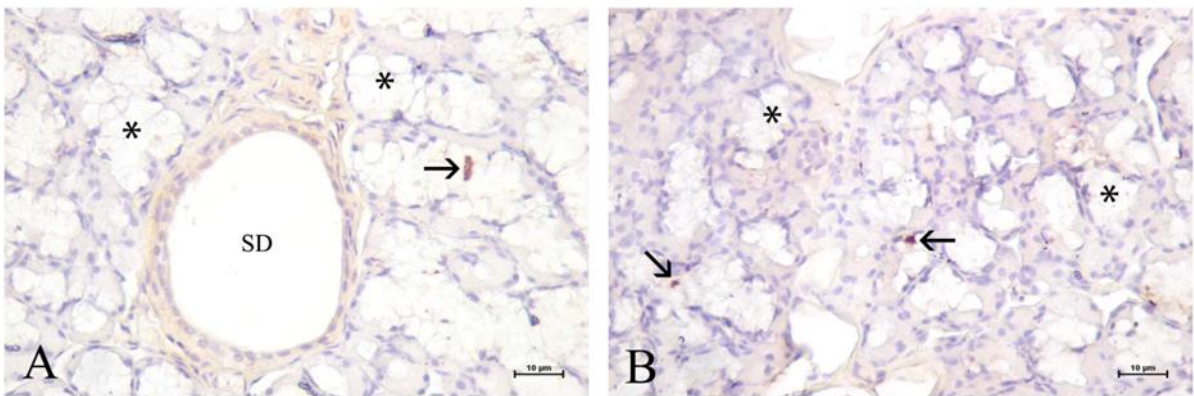


Figure 3: Chymase immunostaining A, arrow: oval-shaped MC_{TC}, glandula (asterisk), secretory ducts (SD), B, arrow: round-shaped MC_{TC}, glandula (asterisk), original magnification X40; range bar, 10 µm.

DISCUSSION

A large number of foreign antigenic substances come into contact with the digestive system. Mast cells are abundant in systems exposed to the outside world, and they are among the first cell groups to respond to pathogens and foreign body entry (Ertugrul et al. 2018). According to researches, mast cells in the salivary glands play an essential role in salivary antigen detection, and they collaborate closely with other antigen-presenting cells, including dendritic cells (David et al. 2010).

When stained with toluidine blue, mast cells exhibit metachromasia due to granules in their cytoplasm (Bancroft and Gamble, 2002), and they can be round, oval, or spindle-shaped depending on where they are in the tissues (Chen et al. 1990). In studies of goats' lower respiratory tract (Kurtdele et al. 2000), female reproductive organs (Karaca et al. 2009), and urinary system (Ertugrul and Kurtdele, 2017), mast cells were observed metachromatically stained with toluidine blue. According to studies conducted in the digestive system (Uslu and Yörük, 2008), tongue (Ertugrul et al. 2018), and goat respiratory (Kurtdele et al. 2000) and urinary systems (Ertugrul and Kurtdele, 2017), mast cells were round, oval, or spindle-shaped, and the nuclei were located centrally or eccentrically. Our findings are consistent with previous research in terms of staining characteristics and morphological properties of mast cells. Mast cells have been observed in the stroma of the submandibular gland, particularly around the vessel, as well as in the connective tissue septa surrounding the gland tissue (Henriksson et al. 1994). According to a study, it was reported that there are a large number of mast cells in the interlobular interstitium of the glandula parotis in rats, especially around the vessels and secretory ducts of the gland (Altunlu et al. 2010). The findings of the researchers on the location of mast cells in the glandula mandibularis are similar to ours.

Mast cell heterogeneity is histochemically classified based on their origins, glycosaminoglycan types, intragranular serine proteinase type (Atkins et al. 1985), histochemical differences, and functional criteria into two subgroups as MMC and CTMC (Hunt et al. 1991). As alcian-blue safranin O is stained sequentially, MMC gives a positive reaction with alcian blue, while CTMC gives a positive reaction with safranin O (Chen et al. 1990). AB (+) mast cells were reported in a study investigating mast cell heterogeneity in the goat urinary system (Ertugrul and Kurtdele, 2017). Studies have been carried out to determine mast cell heterogeneity in the digestive system (Karaca and Yörük, 2004), proventriculus (Aksoy and Çınar, 2008), and tongue (Fletcher and Triantafyllou, 2007). Mast cells were stained in two subtypes, blue-colored AB (+) and pink-red colored

SO (+), in tissues using the AB/SO combined staining method, according to these studies. In glandula mandibularis, we determined two subtypes of mast cells with SO (+) and AB (+) staining. The heterogeneity of mast cells in Angora goats in our study is similar to that found in the previous studies. Also, based on our findings, we observed that CTMCs outnumbered MMCs in the glandula mandibularis.

Mast cell chymase stimulates homeostasis by limiting the toxicity of toxic endogenous peptides (Maurer et al. 2004). Chymase can regulate fibrous tissue accumulation in scar formation (Matsumoto et al. 2003) and also may modulate extracellular matrix remodeling (Fang et al. 1997). It has also been determined to play a role in inflammation, allergy, and angiogenesis mechanisms (Atiakshin et al. 2019). When tissue damage occurs, chymase levels increase, attracting neutrophils to the wound site (Wulff and Wilgus, 2013). In a study of the lingual salivary gland, MC_{TCS} were seen around the salivary gland ducts (Bertoldo et al. 2019). Furthermore, previous research has shown that MC_{TC} is the most common mast cell population in the oral mucosa and dental pulp (Walsh et al. 1995). MC_{TC} cells in the oral cavity have been shown to have a subepithelial localization in the oral mucosa (Yadav et al. 2014). Mast cells found in the connective tissue between salivary secretion ducts were found to be distributed one by one in our study. One of the first areas pathogens and other foreign agents come into contact with the organism is in the oral cavity. The existence of MC_{TCS} in the salivary gland indicates that these cells may play a role in the body's defense system. It is concluded that the histological findings obtained from the MC_{TCS} are an important structural element in the oral cavity defense mechanism.

CONCLUSION

As a result, the mandibular gland of an Angora goat, a local species, was investigated; the morphology, locations, heterogeneity of mast cells, and chymase were all attempted to be specified. This study's results appeared to be in line with previous studies on mast cell properties in a variety of species. Because there were not many studies about mast cells of glandula mandibularis of Angora goat, it is thought that the findings of this study will contribute to the literature. Based on the histological findings, it can be concluded that mast cells play an essential role in the digestive system's defense mechanisms and allergic inflammatory reactions.

Ethics Committee Information: This study is not subject to HADYEEK's permission in accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments

Ethics Committees". In addition, the authors declared that they comply with the Research and Publication Ethics.

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

REFERENCES

- Aksoy A, Çınar K.** Prenatal ve postnatal dönemlerde Gallus gallus domestica'nın bezsel midesinde mast hücrelerinin ontogonitesi, dağılımı ve histokimyasal karakterleri. *Y Y U Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2008; 2: 25-29.
- Altunlu E, Koç A, Kozlu T, Bozkurt YA, Ateş S.** Sıçanlarda prenatal, postnatal ve erişkin dönemlerde glandula parotis'in gelişimi üzerinde histokimyasal ve ışık mikroskopik çalışmalar. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 2010; 5(3): 129-139.
- Atiakshin D, Buchwalow I, Tiemann M.** Mast cell chymase: morphofunctional characteristics. *Histochem Cell Biol.* 2019; 152: 253-269. doi:10.1007/s00418-019-01803-6.
- Atkins FM, Friedmen MM, Rao PVS, Metcalfe DD.** Interaction between mast cells, fibroblast and connective tissue components. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1985; 77(1): 96-102. doi:10.1159/000233760.
- Bancroft JD, Cook HC.** *Manual of Histological Techniques*, Churchill Livingstone Inc., New York. 1984; p.106-110.
- Bancroft JD, Gamble M.** *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th Ed., Churchill Livingstone Inc., Edinburgh. 2002; p.346-347.
- Bertoldo BB, Etchebehere RM, Furtado TCS, de Faria JB, Silva CB, de Araújo MF, Rodrigues DBR, SAL.** Lingual salivary gland hypertrophy and decreased acinar density in chagasic patients without megasophagus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2019; 20(61):e67. doi:10.1590/S1678-9946201961067.
- Caughey GH.** Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol Rev.* 2007; 217: 141-154. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00509.x.
- Chen W, Alley MR, Manktelow BW, Slack P.** Mast cells in the bovine lower respiratory tract: Morphology, density and distribution. *Br Vet J.* 1990; 1146(5): 425-435. doi:10.1016/0007-1935(90)90031-W.
- David ZW, Mabel F, Cavicchia JC.** Distribución de los mastocitos en las glándulas salivales mayores de rata. *Acta odontol. Venez.* 2010; 48(1): 1-9.
- Echtenacher B, Männel DN, Hültnner L.** Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature.* 1996; 381(6577): 75-77. doi:10.1038/381075a0.
- Enerback L.** Mast cells in rat gastrointestinal mucosa: I. Effects of fixation. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1966; 66(3): 289-302. doi:10.1111/apm.1966.66.3.289.
- Ertuğrul T, Kurtdede N.** Sığır koyun ve keçilerin üriner sistem mast hücreleri üzerinde histolojik çalışmalar. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg.* 2017; 57(1): 32-38.
- Ertuğrul T, Tutuncu S, Kabak M, Onuk B.** The distribution and heterogeneity of mast cells in tongue from five different avian species. *Anat Histol Embryol.* 2018; 47(4): 306-312. doi:10.1111/ah.12353.
- Eurell JA, Frappier BL.** *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. Blackwell Publishers, Oxford, UK. 2006; pp. 34-35.
- Fang KC, Raymond WW, Blount JL, Caughey GH.** Dog mast cell alpha-chymase activates progelatinase B by cleaving the Phe88-Gln89 and Phe91-Glu92 bonds of the catalytic domain. *J Biol Chem.* 1997; 272(41): 25628-25635. doi:10.1074/jbc.272.41.25628.
- Fletcher D, Triantafyllou A.** Mast cells in the salivary glands and tongue of the ferret: Demonstration and some histochemical observations. *Anat Histol Embryol.* 2007; 36(1): 3842. doi:0.1111/j.1439-0264.2006.00706.x.
- Galli SJ, Maurer M, Lantz CS.** Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1999; 11(1): 53-59. doi: 10.1016/s0952-7915(99)80010-7.
- Henriksson R, Frdjd O, Gustafsson H, Johansson S, Yi-Qing C, Franzen L, Bjermer L.** Increase in mast cells and hyaluronic acid correlates to radiation-induced damage and loss of serous acinar cells in salivary glands: the parotid and submandibular glands differ in radiation sensitivity. *Br J Cancer.* 1994; 69(2): 320-326. doi:10.1038/bjc.1994.58.
- Hunt C, Campell AM, Robinson C, Holgate T.** Structural and secretory characteristics of bovine lung and skin mast cells: evidence for the existence of heterogeneity. *Clin Exp Allergy.* 1991; 21(2): 173-182. doi:10.1111/j.1365-2222.1991.tb00827.x.
- Irani AM, Schwarz LB.** Mast cell heterogeneity. *Allergy Proc.* 1994; 15(6): 303-308. doi:10.2500/108854194778816472.
- Karaca T, Yörük M.** A morphological and histometrical study on distribution and heterogeneity of mast cells of chicken's and quail's digestive tract. *Y Y U Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2004; 15: 115-121.
- Karaca T, Yörük M, Uslu S, Cetin Y, Uslu BA.** Distribution of eosinophil granulocytes and mast cells in the reproductive tract of female goats in the preimplantation phase. *Vet Res Commun.* 2009; 33(6): 545-554. doi:10.1007/s11259-009-9203-x.
- Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Dileepan KN.** Mast cell: A multi-functional master cell. *Front Immunol.* 2016; 6: 620. doi: 10.3389/fimmu.2015.00620.
- Kurtdede N, Aştı RN, Ergün L, Ergün E.** Ankara keçilerinin alt solunum yolları mast hücreleri üzerinde histolojik çalışmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2000; 47: 339-349. doi:10.1501/Vetfak_00000000459.
- Lin T, Befus AD.** Mast Cells in Mucosal Defensiveness and Pathogenesis. In: *Mucosal Immunity*, Ed; Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienestock J, McGhee JR, Mayer L. Volume 1, Elsevier Academic Press, United States of America. 2002; p. 703-710.
- Matsumoto T, Wada A, Tsutamoto T, Ohnishi M, Isono T, Kinoshita M.** Chymase inhibition prevents cardiac fibrosis and improves diastolic dysfunction in the progression of heart failure. *Circulation.* 2003; 107(20): 2555-2558. doi:10.1161/01.CIR.0000074041.81728.79.
- Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, Piliponsky AM, Welle K, Chatterjea D, Clouthier DE, Yanagisawa MM, Tsai M, Galli, SJ.** Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature.* 2004; 432: 512-516. doi:10.1038/nature03085.
- Pejler G, Ronnberg E, Waern I, Wernersson, S.** Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood.* 2010; 115(24): 4981-4990. doi:10.1182/blood-2010-01-257287.
- Ross MH, Pawlina W.** *Histology a Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology*, 7th Ed., Wolters Kluwer Health, China. 2016; pp.169-172.
- True LD.** *Principles of immunohistochemistry*, Gower Medical Publishing, New York. 1990; p. 67-75.
- Urb M, Sheppard DC.** The role of mast cells in the defence against pathogens. *PLoS Pathog.* 2012; 8(4):e1002619. doi:10.1371/journal.ppat.1002619.
- Uslu S, Yörük M.** Hindilerde sindirim sisteminde mast hücrelerinin dağılımı ve heterojenitesi üzerinde morfolojik

ve histometrik araştırmalar. Y Y U Veteriner Fakültesi Dergisi. 2008; 2: 47-51.

- Walsh LJ, Davis MF, Xu LJ, Savage NW.** Relationship between mast cell degranulation, release of TNF, and inflammation in the oral cavity. *J Oral Pathol Med.* 1995; 24(6): 266-272. doi:10.1111/j.1600-0714.1995.tb01180.x.
- Wolters PJ, Pham CTN, Muilenburg DJ, Ley TJ, Caughey GH.** Dipeptidyl peptidase 1 is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice. *J Biol Chem.* 2001; 276(21): 18551-18556. doi:10.1074/jbc.M100223200.
- Wulff BC, Wilgus TA.** Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? *Exp Dermatol.* 2013; 22(8): 507-510. doi:10.1111/exd.12169.
- Yadav A, Desai RS, Bhuta BA, Singh JS, Mehta R, Nehete AP.** Altered immunohistochemical expression of mast cell tryptase and chymase in the pathogenesis of oral submucous fibrosis and malignant transformation of the overlying epithelium. *Plos One.* 2014; 9(5): e98719. doi:10.1371/journal.pone.0098719.

Investigation of the Effect of Vitamin C and Vitamin E on Serum Protein Fractions in Rats with Experimental Fluorosis

Semiha DEDE^{1*}, Ahmet Cihat ÖNER², Veysel YÜKSEK³, Sedat ÇETİN¹, Ayşe USTA⁴

¹Van YüzüncüYilUniversity, Faculty of Veterinary Medicine, Biochemistry Department, 65090, Van, Turkey

²Van YüzüncüYilUniversity, Faculty of Veterinary Medicine, Pharmacology Department, 65090, Van, Turkey

³Van YüzüncüYilUniversity, Özalp Vocational High School, 65090, Van, Turkey

⁴ Van YüzüncüYilUniversity, Faculty of Science, Chemistry Department, 65090, Van, Turkey

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the effects of vitamins C (vit C) and E (vit E) on the serum protein fractions in rats with experimentally-induced chronic fluorosis. Wistar-Albino rats (male) were used as material (8 groups, each containing 8 rats). The experimental groups were control, protection groups (daily 150 ppm NaF containing drinking water for 16 weeks as ad-libitum, and, on alternate Vit C (100 mg/kg), Vit E (300 mg/kg) and Vit C + Vit E (100 mg/kg + 300 mg/kg) for 16 weeks) therapy groups (daily 150 ppm NaF containing drinking water for 16 weeks as ad-libitum, then normal drinking water as ad-libitum, Vit C (100 mg/kg), Vit E (300 mg/kg) and Vit C + Vit E (100 mg/kg + 300 mg/kg) on alternate for 4 weeks). The end of experimental period, blood samples were collected and serums were obtained. Serum protein fractions in blood samples were determined with cellulose-acetate electrophoresis. Alpha-1 was significantly decreased and beta globulins increased in the experimental fluorosis group. In the groups in which vitamin C, vitamin E and combine combination of vitamin C and vitamin E were given for prevention and treatment, it was observed that these changing values approach to the control group.

Keywords: fluorosis, rat, serum proteins, vitamin C, vitamin E

Deneysel Olarak Florozis Oluşturulan Ratlarda Vitamin C ve Vitamin E'nin Serum Protein Fraksiyonları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

ÖZ

Bu çalışma, deneysel olarak kronik florozis oluşturulan ratlarda vitamin C (vit C) ve E (vit E)'nin serum protein fraksiyonları üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla planlandı. Materyal olarak Wistar-Albino ratlar kullanıldı (Her biri 8 rat içeren, 8 grup). Deneme grupları; kontrol grubu, deneysel florozis grubu, koruma grupları (16 hafta boyunca, içme suyu içeren günlük 150 ppm NaF içeren içme suyu/*ad-libitum* ile birlikte vit C (100 mg / kg), vit E (300 mg / kg) ve vit C + vit E (100 mg/kg + 300 mg/kg)) ve tedavi grupları (16 hafta boyunca 150 ppm NaF içeren içme suyu/*ad-libitum* verildikten sonra tedavi amacıyla 4 hafta vit C (100 mg/kg), vit E (300 mg / kg) ve vit C + vit E (100 mg/kg + 300 mg/kg)) olarak oluşturuldu. Deneme sonunda kan örnekleri toplandı ve serumlar alındı. Bu örneklerde serum protein fraksiyonları selüloz-asetat elektroforezi ile belirlendi. Deneysel florozis grubunda total protein yüzde gram açısından, alfa-1'in önemli oranda azaldığı ve beta globülinlerin arttığı tespit edildi. Korunma ve tedavi amacıyla vitamin C, vitamin E ve vitamin C+vitamin E birlikte verildiği gruplarda, değişen bu değerlerin kontrol grubuna yaklaştığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Florozis, rat, serum proteinleri, vitamin C, vitamin E

To cite this article: Dede S, Öner A.C, Yüksek V, Çetin S, Usta A. Investigation of the Effect of Vitamin C and Vitamin E on Serum Protein Fractions in Rats with Experimental Fluorosis. Kocatepe Vet J. (2021) 14(2):262-267

Submission: 17.11.2020 Accepted: 17.04.2021 Published Online: 30.05.2021

ORCID ID; SD:0000-0001-5744-6327, ACÖ: 0000-0001-5744-6327, VY:0000-0001-7432-4989, SÇ: 0000-0002-6102-8571, AU:0000-0002-5522-3469

*Corresponding author e-mail: sdede@yyu.edu.tr

GİRİŞ

Florozis, uzun süre yüksek dozda flora maruz kalan canlılarda normal fizyolojik ve metabolik fonksiyonları etkileyen, önemli sağlık problemlerine yol açan bir toksikasyondur. Florozisli bireylerde diş, kemik, yumuşak doku ve organlarda gözlenen fonksiyonel ve yapısal değişikliklerin patogeneğinde netleştirilmesi gereken noktalar vardır. Bu dokular üzerinde yapılan moleküler çalışmalardan elde edilen veriler, florür zehirlenmesinin başka hastalıklara neden olabileceğini ve yaşam kalitesini düşürebileceğini ortaya koymaktadır (Guan ve ark., ark., 2000; Yur ve ark. 2013; Yüksek ve ark., 2017; Öner ve ark., 2020).

Florun, toksik mekanizması nedeniyle protein sentezini inhibe etmede önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Deneysel florozis oluşturmak amacıyla kullanılan NaF, iyi bilinen bir protein inhibitörüdür. Flor kaynaklı zehirlenmelerde aktif oksijen ve serbest radikallerin artışına, lipit peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna ve DNA hasarına neden olduğu ve protein sentezini olumsuz etkilediği öne sürülmektedir. DNA hasarının, çift veya tek DNA ipliklerinin kırılması ile olduğu bildirilmektedir (Kleinsasser ve ark., 2001; Wang ve ark., 2004; Kubota ve ark., 2005; Abdel-Wahab, 2013; Yur ve ark., 2013).

Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında yer alan vitamin C ve vitamin E, gen ekspresyonunun düzenlenmesi aşamasından başlayarak, birçok önemli fizyolojik olayda önemli rol alır. Protein, kollajen sentezi, diş, kemik, kıkırdak, ciltte lif oluşumu, nörotransmitter maddeler, hormonlar, L-karnitin gibi önemli biyolojik maddelerin sentezine katılırlar (Møller ve ark., 2004; Li ve Schellhorn, 2007; Loft ve ark., 2008). Florozisli bireylerde özellikle kemik, diş, bağ doku, sinir vb. dokularda artan lipit peroksidasyonu ve azalan antioksidan kaynaklı hasarların önlenmesi ve tedavisinde, vitamin C ve vitamin E uygulamasının faydalı olabileceği yönünde çalışmalar yapılmıştır (Susheela ve Bhatnagar, 2002; Öner ve ark., 2020).

Normal serum proteinleri, elektroforez ile 5 ana protein fraksiyonuna (albümin, α_1 , α_2 , β ve γ -globülinler) ayrılır. Elektroforetik serum protein fraksiyonları konsantrasyonları, çeşitli patolojik ve fizyolojik koşullara bağlı olarak değişebilir. Hepatositler, kan proteinlerinin sentezinde ve salgılanmasında önemli rol oynarlar. Serum proteinleri bağışıklık, pıhtılaşma, küçük molekül taşınması, enflamasyon gibi fizyolojik olaylara katılır. Patolojik ve patolojik olmayan durumlar dahil olmak üzere çeşitli faktörler serumdaki protein konsantrasyonlarını, dolayısıyla serum proteinlerinin tüm profilini etkileyebilir. Albümin, çeşitli lipofilik bileşiklerin ve iki değerlikli katyonların taşınması ve endojen aminoasit deposu görevi görürken, globülinler de birçok önemli görevi yerine getirmektedirler (Manojlović ve ark., 1993; Karagül ve ark., 2000; Mehmetoğlu, 2002; Murray, 2003; Tóthová ve ark., 2017; Yüksek ve ark., 2019; Çetin ve ark., 2020).

Bu çalışma deneysel florozis oluşturulan ratlarda, tedavi ve korunma için vitamin C ve vitamin E uygulanmasının protein metabolizmasındaki etkilerinin anlaşılması amacıyla planlandı.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Bu çalışmada, deney hayvanları kullanımında 3R kuralı çerçevesinde, laboratuvarımızda daha önce yapılan başka bir çalışmadan (Öner ve ark. 2020) elde edilen ve uygun şartlarda saklanan serumlar materyal olarak kullanıldı.

Bir aylık, 100-125 gram ağırlığında, erkek, Wistar-Albino ratlar 20–24°C sıcaklıkta ve % 55–60 nem oranına sahip bir ortamda tutuldu. Tüm gruplar *ad-libitum* standart kemirgen yemiyle beslendi. Çalışma, 8'er hayvandan oluşan 8 grupla gerçekleştirildi.

Deney Grupları

Çalışmanın deneysel düzeni Tablo 1'de özetlendi.

Tablo 1. Deney Grupları

Gruplar	NaF=150 ppm	vitamin C= 100 mg/kg	vitaminE= 300 mg/kg	Normal içme suyu
Kontrol				16 hafta
NaF	16 hafta			
Korunma grubu 1	16 hafta	16 hafta (seçili günlerde)- NaF ile birlikte		
Korunma grubu 2	16 hafta		16 hafta (seçili günlerde)- NaF ile birlikte	
Korunma grubu 3	16 hafta	16 hafta (seçili günlerde)- NaF ile birlikte	16 hafta (seçili günlerde)- NaF ile birlikte	
Tedavi grubu 1	16 hafta	4 hafta (seçili günlerde)- NaF ile birlikte		4 hafta vitamin C
Tedavi grubu 2	16 hafta		4 hafta (seçili günlerde)- NaF ile birlikte	4 hafta vitamin E
Tedavi grubu 3	16 hafta	4 hafta (seçili günlerde)- NaF ile birlikte	4 hafta (seçili günlerde)- NaF ile birlikte	4 hafta vitamin C+E

Üç koruma grubu için 16 hafta boyunca 150 ppm NaF içeren su *ad libitum* ve vitamin C (100 mg/kg), vitamin E (300 mg/kg) ve vitamin C + vitamin E (100 mg/kg + 300 mg/kg) her gün ilgili gruplara uygulandı. Vitamin C suda çözündürülerek, vitamin E mısırozü yağında çözündürülerek oral gavaj ile uygulandı. Üç tedavi grubuna 16 hafta süreyle 150 ppm NaF suda çözündürülerek, *ad-libitum* olarak verildi ve ardından 4 hafta boyunca normal içme suyu *ad libitum* ve vitamin C (100 mg/kg), vitamin E (300 mg/kg) ve vitamin C + vitamin E (100 mg/kg + 300 mg/kg) gün aşırı olarak ilgili gruplara uygulandı (Öner ve ark., 2020).

İdrar Flor Analizi

Florozisin varlığını belirlemek için idrar örnekleri toplandı ve flor seviyeleri, florür elektrotu (Mettler Toledo, ABD) ile ölçüldü. İdrar flor konsantrasyonları kontrol grubunda 0,79 ppm, NaF toksikasyon grubunda 29,71 ppm'di. Korunma ve tedavi amacıyla vitamin uygulanan gruplarda ise 11,5-15,3 ppm olarak saptandı (Öner ve ark. 2020).

Kan Örneği Toplama

Kontrol grubu 16. hafta sonunda, NaF ve koruma grubu ve tedavi grubu ratları ise çalışmanın sonunda ketamin HCl + Ksilazin anestezisi altında, kanlar usulüne uygun olarak alındı. Kan örnekleri 3.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve serum örnekleri

ayrıştırılarak elektroforezde kullanıldı (Öner ve ark., 2020).

Biyokimyasal Analizler

Toplam protein konsantrasyonları biüret yöntemi kullanılarak analiz edildi. Serum protein fraksiyonları, Helena Lab-Titan III® Serum Protein Elektroforez cihazı (Kat No. 3023), Helena Lab-Titan III Selüloz asetat kartları ve Electra HR Buffer (Kat No. 5805) tampon çözeltileri kullanılarak ayırt edildi ve daha sonra Ponceau S Stain solüsyonu ile boyandı. Elektroforez sonrası elde edilen bantlar Platinum 3.0 programında serum protein fraksiyonları açısından değerlendirildi ve protein konsantrasyonları belirlendi. (Helena, Bioscience Europe, İngiltere)

İstatistiksel Analiz

Veriler Tek Yönlü Varyans analizi ile analiz edildi. Çoklu karşılaştırmalar için Duncan testi uygulandı. Farklar P <0.05'te istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (SPSS 22.0, IBM Corporation, ABD).

BULGULAR

Toplam protein içindeki serum protein fraksiyonlarının yüzdesinin ve konsantrasyonunun değerlendirilmesinden sonra elde edilen veriler Tablo 2 ve 3'te özetlendi.

Tablo 2. Çalışma gruplarından elde edilen protein fraksiyonları yüzde gram değerleri (%)

Parametreler	Korunma grupları					Tedavi grupları		
	Kontrol grubu	NaF grubu	NaF +Vit C	NaF +Vit E	NaF +VitE+Vit C	NaF +Vit E	NaF +Vit C	NaF +Vit E+C
Albumin	37,86±1,17 ^a	37,35±2,78 ^a	49,11±2,11 ^{cd}	50,39±2,81 ^d	49,58±1,45 ^{cd}	43,90±1,76 ^{bc}	41,08±1,33 ^{ab}	37,22±1,53 ^a
Alfa 1- globulin (%)	12,56±,92 ^{ab}	10,84±0,84 ^a	13,99±1,03 ^b	14,95±0,87 ^b	13,18±0,82 ^{ab}	13,51±1,29 ^{ab}	13,48±0,68 ^{ab}	14,09±0,54 ^b
Alfa 2- globulin (%)	17,56±1,52 ^d	15,90±1,38 ^{cd}	10,74±0,99 ^a	9,47±1,25 ^a	10,99±0,80 ^{ab}	13,01±1,06 ^{abc}	14,58±0,89 ^{bcd}	17,45±1,39 ^d
Beta - globulin (%)	19,10±0,94 ^{abc}	23,92±1,43 ^d	18,68±0,66 ^{abc}	18,01±0,55 ^{ab}	19,16±0,52 ^{bc}	21,84±0,70 ^c	21,07±0,68 ^{bc}	20,08±0,78 ^{abc}
Gama- globulin (%)	12,92±0,77 ^d	11,98±0,97 ^{cd}	7,51±0,87 ^{ab}	7,16±1,01 ^a	7,08±0,46 ^a	7,74±0,59 ^{ab}	9,78±0,71 ^{bc}	11,15±0,76 ^{cd}
A/G	0,61±0,03 ^a	0,63±0,09 ^a	0,98±0,09 ^{cb}	1,05±0,11 ^c	0,99±0,06 ^{cb}	0,79±0,06 ^{ab}	0,70±0,04 ^a	0,598±0,048 ^a

Serum protein fraksiyon % değerleri bakımından, albümin seviyesi kontrole göre; florozis grubunda değişmezken, korunma grupları ve tedavi vitamin E ve C gruplarının kontrolden fazla olduğu görüldü. Alfa 1 globülin düzeyi florozis grubunda kontrole göre azalırken, korunma ve tedavi grubunda vitamin verilmesi ile arttı ve kontrole yaklaştı. Alfa 2 globülin düzeyi florozis grubunda ve tedavi gruplarında kontrole göre değişmedi. Korunma gruplarında

önemli oranda azaldı. Beta globülin seviyesi kontrole göre; florozis grubunda arttı. Korunma ve tedavi gruplarında azaldı ve kontrole yaklaştı. Gama-globülin seviyeleri kontrol grubuna göre, florozis grubunda değişmezken, korunma ve tedavi (vitamin C ve E) gruplarında azalma olduğu görüldü. A/G oranı ise sadece korunma gruplarında kontrol, florozis ve tedavi gruplarına göre önemli oranda arttığı tespit edildi.

Tablo 3. Protein fraksiyon konsantrasyonları (gr/dl)

Parametreler	Korunma grupları					Tedavi grupları		
	Kontrol grubu	NaF grubu	NaF +Vit C	NaF +Vit E	NaF +VitE+Vit C	NaF +Vit E	NaF +Vit C	NaF +Vit E+C
Total protein	10,199±0,689 ^{bc}	10,038±0,746 ^{bc}	12,655±0,515 ^d	9,202±0,707 ^{abc}	10,264±0,688 ^c	7,220±0,466 ^a	8,160±0,778 ^{abc}	8,042±0,630 ^{ab}
Albumin	3,880±0,335 ^{ab}	3,738±0,364 ^{ab}	6,235±0,443 ^d	4,673±0,517 ^{bc}	5,081±0,368 ^c	3,187±0,281 ^a	3,360±0,323 ^a	2,977±0,213 ^a
Alfa 1-globülin	1,278±0,122 ^{ab}	1,083±0,112 ^{ab}	1,777±0,169 ^c	1,365±0,110 ^b	1,363±0,128 ^b	0,960±0,089 ^a	1,086±0,098 ^{ab}	1,143±0,127 ^{ab}
Alfa 2-globülin	1,785±0,1789 ^d	1,619±0,210 ^{cd}	1,347±0,115 ^{bcd}	0,850±0,110 ^{ab}	1,121±0,101 ^{ab}	0,931±0,080 ^{ab}	1,193±0,141 ^{abc}	1,413±0,177 ^{bcd}
Beta – globülin	1,933±0,125 ^b	2,398±0,242 ^b	2,357±0,091 ^b	1,652±0,131 ^a	1,970±0,155 ^{ab}	1,577±0,119 ^a	1,719±0,175 ^a	1,625±0,159 ^a
Gama- globülin	1,323±0,122 ^d	1,199±0,126 ^{cd}	0,938±0,094 ^{bc}	0,658±0,102 ^{ab}	0,727±0,076 ^{ab}	0,564±0,063 ^a	0,806±0,108 ^{ab}	0,882±0,057 ^{ab}

Korunma gruplarında; Total protein, albümin, alfa 1 globülin düzeylerinin, vitamin C verilen grupta kontrol ve florozis grubuna göre önemli oranda arttığı görüldü. Total protein tedavi vitamin E düzeyi önemli oranda düşük bulundu. Albümin düzeyleri korunma vitamin E ve C gruplarında yüksek bulundu. Alfa 2-globülin seviyesi, koruma gruplarında ve tedavi sonrası E ve vitamin C gruplarında kontrole kıyasla anlamlı olarak daha düşüktü. Beta ve gama globülin düzeyleri, önleme kombine ve tedavi vitamin gruplarında, kontrol ve florozis gruplarına göre daha düşük bulundu.

TARTIŞMA

Flor maruziyeti, protein sentezini ve salgılanmasını engellemekte ve proteinlerin bir zar bölmesinden diğerine taşınmasını etkilemektedir. NaF'ın toksik etkileri nedeniyle, standart yemle yetiştirilen farelere göre florüre maruz kalan farelerde daha az tüylü, soluk beyaz, parlak olmayan kürk ve siyah tırnak gibi protein yetmezliği belirtilerine rastlandığı bildirilmektedir (Mendoza ve ark., 2009; Karn ve Narasimhacharya, 2015; Sharma ve ark., 2018; Tian ve ark., 2020).

Wei ve ark. (2016), inflamatuvar cevap, pıhtılaşma, yara iyileşmesi gibi önemli tepkimelerde majör proteinlerin rol aldığını ve florozis patogeneğinde bu reaksiyonların etkilenmesinin önemli rolü olabileceğini, florür toksisitesi mekanizmasının anlaşılmasına katkıda bulunabileceğini ve florozis için potansiyel biyobelirteçler olarak hizmet edebileceğini bildirmektedir.

Florozisli bireylerde bazı polimorfik serum proteinlerinin konsantrasyonlarında farklılıklar olduğu, bir proteinaz inhibitörü olan transferrin (TF) konsantrasyonunun ve haptoglobulin (HP) konsantrasyonunun azaldığını bildiren bir çalışma mevcuttur (Makarov ve ark., 1999).

Serum proteinleri fizyolojik, beslenme, cinsiyet, çevresel ve genetik faktörlerden kolaylıkla etkilenir. NaF'ın nefrotoksik etkileri vardır ve nefropatinin neden olduğu protein kaybı; serum albümin, alfa 1, beta ve gama-globülin düzeylerinde düşüşe neden olur

(Karagül ve ark., 2000; Onat ve ark., 2002; Tian ve ark., 2020). Toplam protein, albümin, alfa 1, alfa 2 ve beta globülin fraksiyonlarının pek çok durumda değiştiği ve antioksidan tedavisi ile kontrol grubuna yaklaştığını bildiren çalışmalar vardır (Yüksek ve ark., 2017). Deneysel olarak indüklenmiş kronik florozisli ratlarda, vitamin C ve E'nin koruyucu ve terapötik tedavi uygulamaları ile anlamlı pozitif sonuçlar elde edilmiştir. (Öner ve ark., 2020). Bu olumlu sonuçlarla uyumlu olacak şekilde idrar flor düzeyleri de vitamin verilen bütün gruplarda anlamlı şekilde azalmıştır. Bu olumlu sonuçlarda rol oynayan moleküler mekanizmaları açıklığa kavuşturmak için daha fazla çalışma yapılması önerilmektedir.

Sunulan bu çalışmada, toplam protein düzeyi (gr/dl), tedavi sonrası vitamin E grubunda kontrolden düşük olarak, vitamin C koruyucu grubunda ise kontrole göre yüksek bulunmuştur. Total proteindeki bu değişimin, koruma ve tedavi gruplarında bulunan vitamin E ve vitamin C'nin NaF metabolizmasına katılması ve olası antioksidan işlevleri yerine getirirken protein mekanizmasını etkilemesinden kaynaklanmış olduğu düşünülebilir.

Kan albümini, kan ve diğer dokular arasındaki sıvı dengeleyici özelliğini korur. Protein kaybına neden olan fizyolojik ve patolojik durumlarda albümin azalır ve bu azalma immünoglobulin fraksiyonu ile dengelenir (Manojlović ve ark. 1993; Karagül ve ark. 2000; Onat ve ark., 2002; Murray 2003). Bu çalışmada, NaF ile vitamin E verildiğinde, albüminin arttığı görüldü. Bu durum, albüminin vücut bölmeleri arasındaki dengeleyici etkisi ve taşıyıcı rolünün vitamin E tarafından desteklenmiş olması ile ilgili olabilir.

Serum globülin seviyeleri, karaciğer hastalıklarının belirlenmesinde önemli olan diğer testlerle birlikte bilgi sağlayabilir. Akut ve kronik karaciğer hastalıkları, kronik enfeksiyonlar, akut yaygın glomerülonefrit, sarkoidoz, karsinom ve otoimmün hastalıklarda serum globülin fraksiyonu artar. Karaciğer hastalıklarında özellikle β-globülin fraksiyonunda önemli artış gözlenir (Karagül ve ark.,2000; Onat ve ark., 2002).

Alfa1 ve alfa2 bantlarında bulunan alfa1-antitripsin, alfa2-makroglobulin, haptoglobulin ve C3 proteinlerinin

birçok patolojik vakada azaldığı bilinmektedir. Serum lipoproteinindeki artışa bağlı olarak alfa globülin konsantrasyonları da artar. Protein kaybı olan enteropati ve nefropatilerde sentezin azalması veya kayıpların artması nedeniyle tüm bantlarda solukluk görülmektedir (Karagül ve ark. 2000; Onat ve ark. 2002).

Gama (γ) globülinler grubunda immünoglobulinler (Ig A, Ig M, Ig G, Ig E) yer almaktadır. Serum protein fraksiyonlarının değerlendirilmesinde; albümindeki azalma, gama fraksiyonundaki immünoglobulinlerin artışı ile dengelenir. Nefropati, protein kaybına neden olduğundan dolayı, gama globülünde de azalmaya neden olur (Karagül ve ark. 2000; Onat ve ark. 2002). Florür, diş florozisi olan çocuklarda tükürük immünoglobulin düzeyleri üzerindeki artırıcı etkisi nedeniyle, dental florozisli deneklerde çürüğün ilerlemesini durdurabileceği (Güzel ve ark., 2017), bildirilmiş olmakla beraber, florozisin inflamasyon yanıtına neden olduğunu bildiren çalışmalar vardır. iskelet florozisli hastalarda, bağışıklığın etkilenmesine bağlı olarak subklinik inflamatuvar reaksiyon, bir ihtimal olarak bildirilmiştir (Susheela ve Jethanandani, 1994). NaF, serum immünoglobulin A (IgA), immünoglobulin G (IgG) ve immünoglobulin M'yi (IgM) düşürmesi nedeniyle, farelerde kan hücrel ve humoral bağışıklık fonksiyonunu azaltabilir (Guove ark., 2017; Kuang ve ark., 2017). Bu çalışmada ise NaF uygulanması ile gama globülinlerinde herhangi bir değişiklik olmadığı, ancak NaF ile vitamin C ve E uygulanmasının, gama globülinlerini etkilediği ve azalmasına yol açtığı saptandı.

Bu çalışmada uygulanan dozda ve sürede gerçekleşen ve idrar flor düzeylerine göre florozisli olarak kabul edilen ratlarda, mevcut florozis düzeyine bağlı olarak literatür verilerinde belirtilen düzeyde albümin ve total protein düzeylerinde konsantrasyon ve % olarak kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü.

Bu çalışmada; deneysel florozis grubunda sadece, total serum proteinde yüzde (%) fraksiyon olarak alfa-1 önemli oranda azalırken ve beta globülinlerin arttığı tespit edildi. Korunma vitamin C, korunma kombine (Vit C+E) ve tedavi kombine (Vit C+E) gruplarında alfa 1 düzeyinin artarak kontrole yaklaştığı belirlendi. Beta globülin fraksiyonunun deneysel florozis grubunda önemli oranda arttığı ve vitamin verilen bütün gruplarda azalarak kontrol grubuna yaklaştığı tespit edildi. Diğer bütün yüzdeler bakımından, albümin ve A/G oranının korunma vitamin gruplarında anlamlı oranda arttığı, alfa 2'nin korunma grubunda azaldığı ve gama globülünün ise hem korunma hem de tedavi grubunda azaldığı gözlemlendi. Konsantrasyon olarak serum proteinlerinin, florozis grubunda kontrole göre değişmediği görüldü. Vitamin C gruplarında, albümin, total protein ve alfa 1'in arttığı, total proteinin ise vitamin E tedavi grubunda azalırken, diğer bütün tedavi gruplarında değişmediği belirlendi. Alfa 2, beta ve gama globülinler vitamin

C'den etkilenmezken, diğer gruplarda kontrol ve florozis gruplarında azalma olduğu saptandı.

SONUÇ

Bu çalışmada, NaF ve vitamin C, vitamin E'nin birlikte verildiği gruplarda, serum proteinlerinin miktar ve yüzdelik olarak etkilendiği, hem korunma hem de tedavi amaçlı vitamin kullanımının floroziste protein metabolizmasını etkilediği gösterilmiştir. Sonuç olarak, serum fraksiyonlarında yer alan proteinlerin spesifik olarak florozisten etkilenmesinden dolayı, önemli bir tanı ve tedavi takip parametresi olarak değerlendirilebileceği ve bu konuda daha ileri çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Etik Kurul Bilgileri: Tüm çalışma aşamaları ilgili kural ve yönetmeliklere uygun olarak Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu gözetiminde yürütülmüştür (13.11.2014-2014/12).

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abdel-Wahab WM.** Protective effect of thymoquinone on sodium fluoride-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *J Basic Appl Zool.*2013; 66: 263-270.
- Çetin S, Usta A, Ekici P, Dede S, Yüksek V.** Sarcptes ovis ile enfekte koyunlarda serum protein fraksiyon profili. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg.* 2020;15(1):70-75
- Guan ZZ, Xiao KQ, Zeng, XY, Long YG, Cheng YH, Jiang SF.** Changed cellular membrane lipid composition and lipid peroxidation of kidney in rats with chronic fluorosis. *Arch Toxicol.* 2000; 74: 602-608.
- Guo H, Kuang P, Luo Q, Cui H, Deng H, Liu H, Lu Y, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L.** Effects of sodium fluoride on blood cellular and humoral immunity in mice. *Oncotarget.* 2017;8(49):85504-85515.
- Güzel KGU, Kirzioğlu Z, Adiloğlu AK, Ertürk MSÖ.** Effect of fluoride on salivary immunoglobulins and sialic acid. *Rev Assoc Med Bras.* 2017;63:320-323.
- Karagül H, Altintas A, Fidancı UR, Sel T.** Klinik Biyokimya. 2000;161-164. Medisan, Ankara.
- Karn SS, Narasimhacharya AV.** Physiologic and metabolic benefits of formulated diets and *Mangifera indica* in fluoride toxicity. *J Dietary Suppl.* 2015;12.
- Kasai K, Field JB.** Discrimination of multiple forms of phosphoproteinphosphatase in bovine hyroid. *Metabolism.* 1983; 32: 296-307.
- Kleinsasser NH, Weissacher H, Wallner BC, Kastenbauer ER, Harréus UA.** Cytotoxicity and genotoxicity of fluorides in human mucosa and lymphocytes. *Laryngorhinootologie.* 2001;80(4):187-190.
- Kuang P, Deng H, Cui H, Chen L, Fang J, Zuo Z, Deng J, Wang X, Zhao L.** Sodium fluoride (NaF) causes toxic effects on splenic development in mice. *Oncotarget.* 2017;8(3):4703-4717.
- Kubota K, Lee DH, Tsuchiya M, Young CS, Everett ET, Martinez-Mier EA, Snead ML, Nguyen L, Urano F, Bartlett JD.** Fluoride induces endoplasmic

- reticulum stress in ameloblasts responsible for dental enamel formation. *J Biol Chem.* 2005;280(24):23194-23202.
- Li Y, Schellhorn HE.** New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr.* 2007;137:2171–2184.
- Loft S, Møller P, Cooke MS, Rozalski R, Olinski R.** Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker? *Eur J Nutr.* 2008;47:19-28.
- Makarov SV, Spitsyn VA, Kravchuk OI, Bychkovskaia LS.** Qualitative and quantitative variation of serum proteins in fluorosis patients. *Genetika.* 1999;35(9):1305-1308.
- Manojlović Z, Kopitar Z, Lenardic A, Plavsić F.** Changes in plasma proteins and drug distribution in kidney and liver diseases. *Lijecnicki Vjesnik.* 1993;115:366–369.
- Mehmetoğlu I.** *Clinical Biochemistry Manual.* 2002;124–129. Konya: İnci Offset.
- Mendoza-Schulz A, Solano-Agama C, Arreola-Mendoza L, Reyes-Marquez B, Barbier O, Del Razo LM.** The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells. *Toxicol Lett.* 2009;190:179-186.
- Møller P, Viscovich M, Lykkesfeldt J, Loft S, Jensen A, Poulsen HE.** Vitamin C supplementation decreases oxidative DNA damage in mononuclear blood cells of smokers. *Eur J Nutr.* 2004;43:267–274.
- Murray RK.** Plasma proteins and immunoglobulins. Chapter 50. In RK Murray, DK Granner, PA Mayes, VW Radwell (Eds.). *Harper's Illustrated Biochemistry.* 2003;(26th ed., pp. 580–582). New York: Mc Graw Hill Co.
- Onat T, Kaya E, Sozmen EY.** *Human Biochemistry,* 2002;p.184-218. Palme Publishing, Ankara,
- Öner A, Dede S, Yur F, Oner A.** The effect of vitamin C and vitamin E on DNA damage, oxidative status, and some biochemical parameters in rats with experimental fluorosis. *Fluoride.* 2020;53(1 Pt 2):154-163.
- Sharma S, Parashar P, Sharma S, Sharma KP.** Ameliorating role of lycopene, tomato puree, and spirulina + tomato puree on the hematology of fluoride-exposed swiss albino mice. *J Diet Suppl.* 2018;15(6):827-841.
- Susheela AK, Bhatnagar M.** Reversal of fluoride induced cell injury through elimination of fluoride and consumption of diet rich in essential nutrients and antioxidants. *Mol Cell Biochem.* 2002;234/235:335–340.
- Susheela AK, Jethanandani P.** Serum haptoglobin and C-reactive protein in human skeletal fluorosis. *Clin Biochem.* 1994;27(6):463-468.
- Tian X, Xie J, Chen X, Dong N, Feng J, Gao Y, Tian F, Zhang W, Qiu Y, Niu R, Ren X, Yan X.** Deregulation of autophagy is involved in nephrotoxicity of arsenite and fluoride exposure during gestation to puberty in rat offspring. *Arch Toxicol.* 2020;94(3):749-760.
- Tóthová C, Mihajlovičová X, Nagy O.** The Use of Serum Proteins in the Laboratory Diagnosis of Health Disorders in Ruminants. Inbook: Ruminants – The Husbandry, Economic and Health Aspects. DOI: 10.5772/intechopen.72154, 2017.
- Wang AG, Xia T, Chu QL, Zhang M, Liu F, Chen XM, Yang KD.** Effects of fluoride on lipid peroxidation, DNA damage and apoptosis in human embryohepatocytes. *Biomed Environ Sci.* 2004;17:217-222.
- Wei Y, Zeng B, Zhang H, Chen C, Wu Y, Wang N, Wu Y, Shen L.** iTRAQ-based proteomics analysis of serum proteins in Wistar rats treated with sodium fluoride: insight into the potential mechanism and candidate biomarkers of fluorosis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10):E1644.
- Yukse V, Dede S, Ceylan E.** The electrophoretical determination of serum protein fractions in lycopene treated experimental diabetic rats. *Cell Biochem Biophys.* 2013;67(3):1283-1289.
- Yur F, Mert N, Dede S, Deger Y, Ertekin A, Mert H, Yaşar S, Doğan I, Işık A.** Evaluation of serum lipoprotein and tissue antioxidant levels in sheep with fluorosis. *Fluoride.* 2013; 46: 90-96.
- Yüksek V, Ekici P, Dede S, Çetin S, Usta A.** Profiles of serum protein fractions pre-treatment and post-treatment in lambs with pica disorder. *Turk J Vet Res.* 2019;3(2):67-71.

Investigation of Effect of Somatic Cell Count and Seasons on Buffalo Milk Quality

Zeki GÜRLER^{1*}, Erkan KARADAŞ², Esmâ KOZAN³, Hacı Ahmet ÇELİK⁴,
Fatih Mehmet BİRDANE⁵, Recep KARA¹, Ulaş ACARÖZ¹

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Afyonkarahisar Turkey.

²Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Afyonkarahisar Turkey.

³Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Afyonkarahisar Turkey.

⁴Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Afyonkarahisar Turkey.

⁵Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Afyonkarahisar Turkey.

ABSTRACT

The somatic cell count (SCC), chemical composition and microbiological quality of milk are the most important features in terms of overall quality of raw milk. In our study, the seasonal SCC, chemical composition and microbiological qualities of the milk obtained were measured, and the seasonal effect on these parameters was investigated. In terms of SCC, the maximum value of the summer sample was the highest with 465000 units/ml (average 233500 units/ml), while in terms of microbiological criteria, the total bacteria count, Enterobacteriaceae count, coliform count and *E. coli* count values were found to be higher than other seasons. As for the chemical composition, it was observed that the milk fat and lactose values were not affected by the season, but the protein, dry matter and non-fat dry matter values of the summer samples (respectively average values 5.53%, 18.83%, 10.34%) were at the highest level. It is considered that hygiene measures should be developed in terms of hot seasons and additional measures should be taken in terms of udder health.

Keywords: somatic cell count, milk chemistry, buffalo milk, seasonal effect

Somatik Hücre Sayısının ve Mevsimin Manda Süt Kalitesine Etkisinin Araştırılması

ÖZ

Sütün somatik hücre sayısı (SHS), kimyasal kompozisyonu ve mikrobiyolojik kalitesi çiğ sütün genel kalitesi açısından en önemli özelliklerdir. Çalışmamızda manda sütlerinin mevsimsel olarak SHS, kimyasal kompozisyonu ve mikrobiyolojik kaliteleri ölçülmüş, bu parametreler üzerinde mevsim etkisi araştırılmıştır. SHS açısından yaz numunesi maksimum değeri 465000 adet/ml ile en yüksek seyredirken (ortalama 233500 adet/ml) genel olarak mikrobiyolojik kriterler açısından da yaz mevsimi numunelerinin toplam bakteri sayısı, Enterobacteriaceae sayısı, koliform sayısı ve *E. coli* sayısı değerlerinin diğer mevsimlere göre yüksek olduğu görüldü. Kimyasal kompozisyon için ise süt yağı ve laktoz değerlerinin mevsimden etkilenmediği, ancak yaz numunelerinin protein, kuru madde ve yağsız kuru madde değerlerinin (sırasıyla ortalama değerleri %5.53, %18.83, %10.34) en yüksek düzeyde seyrettiği görülmüştür. Sıcak mevsimler açısından hijyen tedbirlerinin geliştirilmesi ve meme sağlığı açısından ek önlemler alınması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: somatik hücre sayısı, süt kimyası, manda sütü, mevsimsel etki

To cite this article: Gürler Z., Karadaş E., Koşan E., Çelik H.A., Birdane F.M., Kara R., Acaröz U. Investigation of Effect of Somatic Cell Count and Seasons on Buffalo Milk Quality. Kocatepe Vet J. (2021) 14(2):268-273

Submission: 10.04.2021 Accepted: 26.05.2021 Published Online: 31.05.2021

ORCID ID: : ZG: 0000-0002-9037-2945, EKaradaş: 0000-0001-8000-8499, EKoşan: 0000-0001-9473-6198, HAC: 0000-0002-7934-3123, FMB: 0000-0003-0026-800X, RK: 0000-0002-9257-75067, UA: 0000-0002-1533-4519

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

GİRİŞ

Süt, insan beslenmesinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Ancak hijyenik olmayan şartlarda üretilmesine, saklanmasına, işlenmesine ve gerekli kontrollerinin yapılmamasına bağlı olarak insan sağlığına zararlı hale gelebilmektedir (Diler ve Baran, 2014). İyi kalitede üretilen bir sütün, bakteri ve somatik hücre sayısı (SHS) düşük, kimyasal kompozisyonunun elde edildiği türe uygun olması, kötü koku, çöküntü, antibiyotik kalıntısı ve kimyasal madde bulundurmaması gerekmektedir. İşletmelerin, bilgi ve teknoloji kullanım düzeyinin sınırlı olmasının; üretilen sütün kalite ve hijyeninin korunması, sağım yönetimi ve sütün muhafazası ile ilgili konuların ihmal edilmesine neden olacağı bildirilmektedir (Koç, 2005). Sütte somatik hücre sayısının artmasıyla sütün yağ, protein, laktoz ve toplam kuru madde muhtevalarının önemli derecede azaldığı (Schukken ve ark., 2003; Bueno ve ark., 2005; Moroni ve ark., 2006), bu farklılıkların ve değişimlerin önemli olduğu (Park ve ark., 2007) bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda inek sütlerinde SHS'nin sütün kimyasal bileşimine etkisi olduğu bildirilmektedir (Patır ve ark., 2010; Ayaşan ve ark., 2011; Temelli ve Şerbetçioğlu, 2011; Diler ve Baran, 2014; Şahin ve Kaşıkçı, 2014). Ayrıca somatik hücre sayısındaki artış, süt kalitesini olumsuz etkilemesinin yanı sıra süt veriminde azalma ve bununla birlikte de ekonomik kayıplara neden olabilmektedir (Şahin ve Kaşıkçı, 2015). Manda sütlerinde somatik hücre sayısı ve mevsimlerin sütün kimyasal kompozisyonunu özellikle de manda sütünün değerli bir parametresi olan süt yağı üzerine etkisinin belirlendiği yeterli çalışmaya rastlanmamıştır. Bu amaçla 10 adet manda ineğinden temin edilen süt örnekleri 4 mevsim boyunca takip edilerek somatik hücre sayısı, süt kompozisyonu ile mikrobiyolojik özellikleri araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Yapılan bu çalışmada Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nde bulunan 10 adet manda ineğine ait süt örnekleri kullanılmıştır. Bu amaçla seçilen hayvanlardan, Kasım 2019 – Kasım 2020 tarihleri arasında 4 mevsime uygun olacak şekilde rutin sağım esnasında 50 ml süt örneği alınmıştır. Alınan süt örnekleri soğuk zincir altında laboratuvara getirilerek aynı gün analize alınmıştır.

Metot

Somatik Hücre Sayımı: Manda sütlerinde somatik hücre sayısı Somatic Cell Counter (Chemometec SCC 100) cihazı ile cihaza uyumlu ölçüm kaseti (Chemometec SCC Casette) ve Solüsyon (Chemometec Reagent C) kullanılarak belirlenmiştir.

Kimyasal Analiz: Manda süt örneklerinin kimyasal bileşenleri (yağ, protein, laktoz ve kuru madde) Milk Analyzer MID - Infrared (MIRIS) ile belirlenmiştir.

Mikrobiyolojik analizler: Manda süt örneklerinin 10'ar ml'si 90 ml steril peptonlu su ile homojenize edilmiştir. Daha sonra 1:10 seyreltilmiş numuneden seri dilüsyonlar hazırlanmış ve besi yerine ekim yapılmıştır. Örneklerde toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı (ISO, 2013), *Staphylococcus* sayısı (ISO, 2018), Enterobacteriaceae sayısı (ISO, 2004), Koliform sayısı (ISO, 2006) ve *E. coli* (ISO, 2018) sayısı belirlenmiştir.

İstatistiksel analiz: Analiz sonuçlarında, mevsime ait süt örnekleri üzerinde mevsimsel etki arasındaki farklılıklar tek yönlü ANOVA ile belirlenmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmada elde edilen sonuçlara bakıldığında somatik hücre sayısı bakımından en yüksek ortalamanın yaz aylarında olduğu ve en düşük ortalamanın ise ilkbahar sütlerinde olduğu görülmüştür ($p < 0.05$; Tablo 1). Çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzer şekilde Sharif ve ark. (2007), çalışmasında SHS ortalama $2.06 \pm 1.09 \times 10^5$ olarak belirlemiştir. Tripaldi ve ark. (2003) yılında yaptıkları çalışmada ortalama SHS'yi 221.28×10^3 /ml tespit etmişlerdir. Bu sonuç ise çalışmamızdaki yaz numunelerinin sonuçlarına yakın olup, ilkbahar sonuçlarından daha yüksektir (Tripaldi ve ark., 2003). Singh ve Ludri (2001)'nin çalışmalarında ise mevsimsel olarak ölçülen SHS sonuçları yaz (sıcak, kuru) için 1.08×10^5 /ml olarak, ilkbahar (sıcak, yağışlı) için 1.36×10^5 /ml ve sonbahar, kış dönemi (soğuk) için 0.76×10^5 /ml olarak bildirilmiştir. Sıcak ve yağışlı dönemdeki SHS artışının sıcaklığa ve nem stresine bağlı olabileceği bildirilmektedir (Singh ve Ludri, 2001).

Çalışmamızda toplam bakteri varlığı açısından yapılan analizlerde ilkbahar, yaz dönemleri ile sonbahar, kış dönemleri arasında farklılık olduğu, sonbahar ve kış dönemlerinde toplam bakteri varlığının anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p < 0.05$; Tablo 2). Bunun nedeninin sonbahar ve kış döneminde sıcaklığın düşmesi sonucu bakteri üremesinin azalması ya da yaz ve ilkbahar dönemlerinde çevre sıcaklığının yüksek olması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Han ve ark. (2007), çalışmalarında manda sütünün toplam bakteri sayısı ortalaması $5.59 \log \text{ kob/ml}$ olarak tespit edilmiş olup çalışmamızdaki tüm mevsim ortalamalarından yüksek olduğu görülmüştür. Duangpan ve Suriyaphan (2009) çalışmalarında toplam bakteri varlığını $4.18-4.38 \log \text{ kob/ml}$ olarak tespit etmişlerdir. Bu sonucun özellikle sağımda görev alan personel hijyenine bağlı olduğu bildirilmiştir (Duangpan ve Suriyaphan, 2009).

Tablo 1. Manda Sütlerinde Somatik Hücre Sayısı (ml)
Table 1. Somatic Cell Count in Buffalo Milk (ml)

	Mevsim	n	Ortalama	SD	Minimum	Maksimum
Somatik Hücre Sayısı	İlkbahar	10	10500.00 ^b	15855.25	0.00	39000.00
	Yaz	10	233500.00 ^a	114810.23	88000.00	465000.00
Somatik Hücre Sayısı	Sonbahar	10	207000.00 ^a	80455.65	117000.00	386000.00
	Kış	10	44700.00 ^b	38038.14	10000.00	117000.00

a – b Farklı harflerle aynı gruptaki her sütun periyodundaki ortalamalar mevsimden önemli ölçüde etkilendi (p <0.05).

Staphylococcus sayıları açısından baktığımızda istatistiksel olarak ilkbahar-yaz ve sonbahar-kış ikilisinin birbirlerinden farklı oldukları tespit edilmiştir (p<0.05; Tablo 2). Han ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada ortalama Staphylococcus sayısı 1.68 log kob/ml olarak tespit etmişlerdir. Bu değer

çalışmamızdaki tüm mevsim ortalamalarından daha düşüktür. Yun ve ark. (2006), tarafından yapılan bir çalışmada ise ortalama Staphylococcus sayısı 1.80 log kob/ml olarak tespit edilmiş olup, bu değer çalışmamızdaki ortalama değerlerden daha düşüktür.

Tablo 2. Manda Sütlerinde Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları (log kob/ml)
Table 2. Results of Microbiological Analysis in Buffalo Milk (log cfu/ml)

Parametreler	Mevsim	n	Ortalama a	SS	Minimum	Maksimum
Toplam Bakteri Sayısı	İlkbahar	10	4.27 ^a	0.39	3.70	4.75
	Yaz	10	4.47 ^a	0.37	4.00	4.85
	Sonbahar	10	2.45 ^b	1.71	0.00	3.85
	Kış	10	2.23 ^b	1.59	0.00	3.70
Staphilococcus	İlkbahar	10	4.43 ^a	0.26	3.90	4.70
	Yaz	10	3.31 ^b	0.27	2.95	3.69
	Sonbahar	10	1.93 ^c	1.41	0.00	3.70
	Kış	10	2.36 ^c	1.35	0.00	3.70
Enterobacteriaceae	İlkbahar	10	2.13 ^{ab}	1.54	0.00	3.78
	Yaz	10	3.23 ^a	0.47	2.30	3.79
	Sonbahar	10	0.55 ^c	1.16	0.00	3.00
	Kış	10	1.82 ^b	1.59	0.00	3.30
Koliform	İlkbahar	10	1.59 ^a	1.42	0.00	3.30
	Yaz	10	2.34 ^a	1.31	0.00	3.60
	Sonbahar	10	0.00 ^b	0.00	0.00	0.00
	Kış	10	0.25 ^b	0.78	0.00	2.48
E. coli	İlkbahar	10	0.00	0.00	0.00	0.00
	Yaz	10	0.51	1.07	0.00	2.60
	Sonbahar	10	0.46	0.97	0.00	2.30
	Kış	10	0.00	0.00	0.00	0.00

a – c Farklı harflerle aynı mikrobiyolojik parametredeki her sütun periyodundaki ortalamalar mevsimden önemli ölçüde etkilendi (p <0.05); SS: Standart Sapma

Enterobacteriaceae sayıları açısından baktığımızda istatistiksel olarak tüm mevsimlerin ortalamalarının farklı oldukları tespit edilmiştir ($p < 0.05$; Tablo 2). El-Mokadem ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada devlet çiftlikleri ve özel çiftliklerde yapılan analizlerde ortalama değerleri sırasıyla; $9.71 \times 10^4 \pm 4.56 \times 10^4$ ve $2.95 \times 10^5 \pm 5.93 \times 10^4$ kob/ml olarak tespit etmişlerdir. El Zubeir ve Ahmed (2007) çalışmalarında Enterobacteriaceae seviyesini ortalaması 5.0×10^6 kob/ml tespit etmişlerdir. Bu değerler çalışmamızdan oldukça yüksektir.

Yapılan çalışmada koliform bakteriler sayısında ilkbahar ve yaz mevsimlerinin sonbahar ve kışa göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$; Tablo 2). Han ve ark. (2007) çalışmasında koliform bakteri sayısını 2.42 ± 0.12 log kob/ml olarak bildirmişlerdir. Bu değer yaz mevsimi değerlerine nispeten yakın olmasına rağmen çalışmada elde edilen tüm koliform sayılarından yüksektir. Gürler ve ark. (2013) çalışmasında ise Koliform bakteri sayısını ortalama 2.95 ± 0.21 log kob/ml olarak bulmuşlardır. Mevsimsel olarak sırasıyla ilkbahar, yaz,

sonbahar ve kış değerlerinin; 2.90 ± 0.18 , 3.11 ± 0.14 , 2.95 ± 0.17 ve 2.83 ± 0.22 log kob/ml seviyelerinde olduğu görülmektedir. Tüm mevsimlerde çalışmamızın bulguları daha düşük seviyede tespit edilmiştir.

İlkbahar ve kış mevsimlerinde *E. coli* tespit edilmemiştir. Aynı zamanda tüm mevsimler için yapılan analizde istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmektedir ($p > 0.05$; Tablo 2). Han ve ark. (2007) çalışmalarında ortalama *E. coli* sayısını 1.53 log kob/ml olarak tespit etmişlerdir. Yun ve ark. (2006) ise çalışmasında *E. coli* ortalamasını 1.83 log kob/ml olarak bildirmişlerdir. Bu değerler çalışmamızdaki tüm mevsimlerden yüksektir.

Manda sütlerinin kimyasal analizlerinde toplam kuru madde miktarı açısından yapılan değerlendirmede elde edilen sonuçların ilkbahar ve kış mevsimlerinin benzer değerlerde olduğu, yaz mevsiminin ve sonbahar mevsiminin değerlerinin ise farklı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$; Tablo 3).

Tablo 3. Manda Sütlerinde Kimyasal Analiz Sonuçları (%)
Table 3. Results of Chemical Analysis in Buffalo Milk (%)

Parametreler	Mevsim	n	Ortalama a	SS	Minimum	Maksimum
Toplam Kuru Madde (%)	İlkbahar	10	16.62 ^{ab}	2.11	12.84	20.11
	Yaz	10	18.83 ^a	3.04	14.23	25.83
	Sonbahar	10	16.10 ^b	2.39	12.22	19.68
	Kış	10	18.27 ^{ab}	3.07	13.00	21.82
Yağsız Kuru Madde (%)	İlkbahar	10	9.40 ^{ab}	0.82	7.86	10.34
	Yaz	10	10.34 ^a	0.98	7.77	11.38
	Sonbahar	10	8.82 ^b	0.92	6.85	10.10
	Kış	10	9.30 ^{ab}	1.97	5.52	11.18
Yağ %	İlkbahar	10	7.22	1.78	4.75	10.26
	Yaz	10	8.49	2.46	5.51	14.68
	Sonbahar	10	7.09	2.53	4.12	10.78
	Kış	10	8.72	2.25	4.43	11.52
Protein (%)	İlkbahar	10	4.32 ^b	0.53	3.57	5.06
	Yaz	10	5.53 ^a	0.68	4.45	6.75
	Sonbahar	10	4.18 ^b	0.56	3.59	5.46
	Kış	10	4.64 ^b	0.77	3.22	5.61
Laktoz (%)	İlkbahar	10	4.38	0.75	3.03	5.22
	Yaz	10	4.12	1.14	1.08	4.98
	Sonbahar	10	4.14	0.44	3.67	4.82
	Kış	10	4.12	1.35	1.20	5.53

a – b Farklı harflerle aynı kimyasal parametredeki her sütun periyodundaki ortalamalar mevsimden önemli ölçüde etkilendi ($p < 0.05$); SS: Standart Sapma

Han ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada toplam kuru madde değerlerinin çalışmamızla benzer şekilde %16.39-18.48 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Hashmi ve Saleem (2015) tarafından yapılan çalışmada ise ortalama toplam kuru madde değeri %16.38 olarak bulunmuştur. Bu değer ise sonbahar mevsimi sonuçları ile benzer ancak diğer mevsimlere göre daha düşüktür. Yağsız kuru madde miktarı açısından elde edilen değerlere bakıldığında yaz mevsiminin en yüksek değerde olduğu ve istatistiksel olarak kış ve ilkbahar mevsimlerine kısmen yakın olduğu, sonbaharın ise en düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$; Tablo 3). Hashmi ve Saleem (2015), 120 süt örneği üzerinde yaptıkları çalışmada yağsız kuru madde değerini ortalama olarak %7.04 olarak bildirmiş olup, tespit edilen değer çalışmamıza göre düşük seviyededir. Gürler ve ark. (2013) yaptıkları çalışmalarında elde edilen ortalama 8.56 ± 0.32 değerinin, çalışmamızın sonbahar sonuçlarına benzer olduğu görülmüştür.

Manda sütlerinin mevsimler arasında yağ oranları açısından istatistiksel farklılık olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$; Tablo 3). Han ve ark. (2012) analiz ettikleri örneklerin yağ oranlarının %6.57-7.97 aralığında; Varricchio ve ark. (2007) ise farklı şekillerde beslenen süt üretimi için yetiştirilen mandalardan alınan örneklerde ortalama değer $\%8.3$ olduğunu bildirmişlerdir. Han ve ark. (2012)'nin bulgularının bizim çalışmamızın yağ seviyesi ortalamasından düşük olduğu, Varricchio ve ark.(2007)'in bulgularına ise benzer olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda yaz mevsimi örneklerinin diğer 3 mevsime göre daha yüksek oranda protein içerdiği tespit edilmiştir ($p < 0.05$; Tablo 3). Bu değerlerin, Han ve ark. (2012)'nin çalışmasında bildirilen %4.59-5.37 aralığındaki değerler ile benzer olduğu görülmüştür. Han ve ark. (2007) yaptıkları bir başka çalışmalarında, ortalama protein değerinin %4.86 olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir. Tespit edilen bu değer yaz mevsimi sonuçlarımızdan düşük olduğu saptanmıştır. Laktoz miktarları açısından bakıldığında laktoz miktarlarının mevsimle değişiminin istatistiksel bir fark oluşturmadığı mevsim ortalamalarının benzer olduğu görülmüştür ($p > 0.05$; Tablo 3). Yun ve ark. (2006) çalışmasında %4.67 olarak tespit edilen laktoz miktarının çalışmamıza göre yüksek olduğu görülmüştür.

SONUÇ

Sonuç olarak; geçmişten günümüze sağlıklı beslenmede önemli bir yere sahip olan manda sütü, içerdiği zengin besin maddeleri ve mandanın dünyanın farklı coğrafyalarında yetiştirilmesi nedenleri ile süt ve süt ürünleri konusunda ağırlığı artan bir öneme sahiptir. Teknolojinin gelişmesi ile ürünlerin besin maddelerinin nitelikleri daha sağlıklı ölçülmeye başlanmıştır. Somatik hücre sayısı (SHS), sütün

kompozisyonu ile süt ve süt ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesi arasındaki ilişkiler çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmektedir. Yapılan çalışmamızda 10 manda ineğinden 4 mevsim boyunca elde edilen manda sütlerinin SHS, kimyasal kompozisyonu ve mikrobiyolojik özellikleri ölçülmüştür. SHS farklılıklarının sıcaklık stresi ve neme bağlı olabileceği düşünülmektedir. Sütün ekonomik değerini belirlemede başlıca etkenlerden biri olan yağ parametresi incelendiğinde yağ miktarlarının mevsimden etkilenmediği görülmüştür. Aynı zamanda protein, kuru madde ve yağsız kuru madde miktarları açısından bakıldığında yaz mevsimi ortalamasının diğer mevsimlerden yüksek olduğu ve yaz mevsimini temsil eden numunelerin SHS maksimum değerinin en yüksek olduğu bunun içinde meme sağlığı rutin kontrollerine devam edilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

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

Etik İzin: Bu çalışma "Hayvan Deneyleti Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 8 (k) gereği HADYEK iznine tabi değildir. Bu yazıda sunulan veri, bilgi ve belgeler akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde edilmiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 18.TEMATİK.01 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Ayaşan, T., Hızlı, H., Yazgan, E., Kara, U., Gök, K. (2011). Somatik hücre sayısının süt üre nitrojen ile süt kompozisyonuna olan etkisi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 17(4), 659-662.
- Bueno, V. F. F., Mesquita, A. J. D., Nicolau, E. S., Oliveira, A. N. D., Oliveira, J. P. D., Neves, R. B. S., Mansur, J.R.G., Thomaz, L. W. (2005). Somatic cell count: relationship to milk composition and period of the year in Goiás State, Brazil. Ciência Rural, 35(4), 848-854.
- Diler, A., Baran, A. (2014). Erzurum'un Hınıs ilçesi çevresindeki küçük ölçekli işletme tank sütlerinden alınan çiğ süt örneklerinin bazı kalite özelliklerinin belirlenmesi. Alınteri Zirai Bilimler Dergisi, 26(1), 18-24.
- Duangpan, W., & Suriyaphan, O. (2009). Preliminary assessment of microbiological quality of raw buffalo milk commercially produced in Thailand. As. J. Food Ag-Ind, 368-373.
- El Zubeir, I. E., & Ahmed, M. I. (2007). The hygienic quality of raw milk produced by some dairy farms

- in Khartoum State, Sudan. *Research Journal of Microbiology*, 2(12), 988-991.
- El-Mokadem, E. A., El-Leboudy, A. A., & Amer, A. A.** (2020). Occurrence of Enterobacteriaceae in Dairy Farm Milk. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, 64(2).
- Gürler, Z., Kuyucuoğlu, Y., Pamuk, Ş.** (2013). Chemical and microbiological quality of Anatolian Buffalo milk. *African Journal of Microbiology Research*, 7(16), 1512-1517.
- Han, B. Z., Meng, Y., Li, M., Yang, Y. X., Ren, F. Z., Zeng, Q. K., Nout, M. R.** (2007). A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. *Food Control*, 18(6), 742-746.
- Han, X., Lee, F. L., Zhang, L., Guo, M. R.** (2012). Chemical composition of water buffalo milk and its low-fat symbiotic yogurt development. *Functional Foods in Health and Disease*, 2(4), 86-106.
- Hashmi, S., Saleem, Q.** (2015). An investigation on microbiological and chemical quality of buffalo milk supplies. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 4(1), 78-83.
- ISO 16649-1.** (2018). Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* — Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.
- 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.
- ISO 4832.** (2006). Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique.
- ISO 4833-1.** (2013). Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique.
- ISO 6888-1.** (2018). Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci Part 1: Method using Baird-Parker agar medium.
- Koç A.** (2015). Effects of somatic cell count and some environmental factors on milk yield and constituents of Red-Holstein cows. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 21(3), 439-447.
- Moroni, P., Rossi, C. S., Pisoni, G., Bronzo, V., Castiglioni, B., Boettcher, P. J.** (2006). Relationships between somatic cell count and intramammary infection in buffaloes. *Journal of dairy science*, 89(3), 998-1003.
- Park, Y. K., Koo, H. C., Kim, S. H., Hwang, S. Y., Jung, W. K., Kim, J. M., Shin, S., Kim, R.T., Park, Y. H.** (2007). The analysis of milk components and pathogenic bacteria isolated from bovine raw milk in Korea. *Journal of Dairy Science*, 90(12), 5405-5414.
- Patr, B., Can, Ö. P., Gürses, M.** (2010). Somatic cell counts in raw cow milk collected from different city. *Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, Fırat Üniversitesi*, 24(2), 87-91.
- Schukken, Y. H., Wilson, D. J., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L., Gonzalez, R. N.** (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary research*, 34(5), 579-596.
- Sharif, A., Ahmad, T., Bilal, M. Q., Yousaf, A., Muhammad, G.** (2007). Effect of severity of sub-clinical mastitis on somatic cell count and lactose contents of buffalo milk. *Pakistan Veterinary Journal*, 27(3), 142.
- Singh, M., Ludri, R. S.** (2001). Somatic Cell Counts in Marrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) during different stages of lactation, parity and season. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14(2), 189-192.
- Şahin, A., Kaşıkçı, M.** (2014). Esmer ineklerde somatik hücre sayısı ve bazı çiğ süt parametreleri arasındaki ilişkilerin belirlenmesi. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2(5), 220-223.
- Şahin, A., Kaşıkçı, M.** (2015). Yetiştirici Elinde Bulunan Esmer İneklerinin Çiğ Süt Somatik Hücre Sayısı Üzerine Bazı Çevresel Faktörlerin Etkilerinin Belirlenmesi. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3(7), 507-509.
- Temelli, S., Şerbetcioğlu, T.** (2011). Bir süt işletmesinde işlenen inek sütlerinde somatik hücre sayısının dört yıllık periyottaki değişiminin incelenmesi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 30(1), 1-7.
- Tripaldi, C., Terramoccia, S., Bartocci, S., Angelucci, M., Danese, V.** (2003). The effects of the somatic cell count on yield, composition and coagulating properties of Mediterranean buffalo milk. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 16(5), 738-742.
- Varricchio, M. L., Di Francia, A., Masucci, F., Romano, R., Proto, V.** (2007). Fatty acid composition of Mediterranean buffalo milk fat. *Italian Journal of Animal Science*, 6(sup1), 509-511.
- Yun, M.E.N.G., Wei, S.I., Li, Y.U., Bei-zhong, H.A.N.** (2006). Analysis of microbiological and chemical compositions of buffalo milk in Guangxi [j]. *China Dairy Industry*, 3. of hepatoprotective and anticancer properties of aqueous olive leaf extract in chemically induced hepatocellular carcinoma in rats. *Am. J. Med. Med. Sci.* 2011; 1(1):15-22.

Penile Prolapse in a Pekin Duck (*Anas platyrhynchos domesticus*)

Ugur ERSOZ^{1*}, Sıtkıcan OKUR¹, Mumin Gokhan SENOCAK¹, Latif Emrah YANMAZ¹,
Ferda TURGUT¹, Yakup KOCAMAN¹

¹Ataturk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, 25240, Erzurum, Turkey

ABSTRACT

In this case, a 7-month-old male, Pekin duck with the prolapsed phallus was presented. As a result of physical examination, amputation was decided due to the excessive necrotic areas on the phallus. The amputation process was performed on cut mode with electrosurgical monopolar cautery. Tissues were checked for hemorrhage and no evidence of bleeding was found. After the amputation process was completed, topical antibiotic were applied to the basic part of the phallus and the remained tissue was replaced into the cloaca. At the end of the first postoperative day, no clinical abnormalities were observed, and duck started to eat normally. In conclusion, amputation of prolapsed phallus may be accomplished by electracautery. However postoperative care is important to prevent complications such as abscess.

Key Words: Amputation, Duck, Electrocautery, Phallus, Prolapse.

Bir Pekin Ördeğinde Penil Prolapsı (*Anas platyrhynchos domesticus*)

ÖZ

Bu vakada fallus prolapsı olan 7 aylık bir erkek Pekin ördeği sunulmuştur. Yapılan fizik muayene sonucunda fallustaki aşırı nekrotik alanlar nedeniyle amputasyona karar verildi. Ampütasyon işlemi kesme modundaki monopolar elektrocerrahi koter ile gerçekleştirildi. Operasyon sonrası dokular kanama açısından kontrol edildi ve kanama bulgusuna rastlanılmadı. Ampütasyon işlemi tamamlandıktan sonra fallusun kök kısmına topikal antibiyotik uygulandı ve kalan doku kloakaya reddedildi. Postoperatif ilk günün sonunda klinik anormallikler gözlenmedi ve ördek normal yemeye başladı. Sonuç olarak, prolabe fallusun amputasyonu elektrokoter yöntem ile gerçekleştirilebilir. Ancak apse gibi komplikasyonları önlemek için postoperatif bakım önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Amputasyon, Elektrokoter, Fallus, Ördek, Prolaps

To cite this article: Ersoz U, Okur S, Senocak M.G, Yanmaz L.E, Turgut F, Kocaman Y. Penile Prolapse in a Pekin Duck (*Anas platyrhynchos domesticus*). Kocatepe Vet J. (2021) 14(2): 274-277.

Submission: 05.02.2021 Accepted: 30.03.2021 Published Online: 06.05.2021

ORCID ID; UE: 0000-0002-1687-2327 SO: 0000-0003-2620-897X MGS: 0000-0002-8855-8847 LEY: 0000-0001-5890-8271 FT: 0000-0003-2956-7548 YK: 0000-0002-3580-7782 *Corresponding author e-mail: ugur.ersoz@atauni.edu.tr

INTRODUCTION

The genitals of birds are extremely diverse, especially in waterfowls. Birds are the animals with the most different genital organ morphology among the amniotic species (Brennan et al. 2008, Briskie et al. 1997, McCracken et al. 2001). Few of the avian species have a penis (Gilbert et al. 1979). Only 3% of all bird species have a phallus or intromittent organ, and all of these species are members of the basal lineage of surviving birds (Briskie et al. 1997, Jamieson and Barrie 2011). At rest, the penis is held inverted (from outside to inside) within the phallic sac (saccus phallic) in the ventral wall of the cloaca. Unlike other amniotes, the erectile mechanism of the bird's penis is lymphatic rather than vascular. During eversion, lymph accumulates in two lymphatic spaces at the base of the cloaca and enters a lymphatic lumen inside the penis forcing it out of the phallic sac (Brennan et al. 2010). There is no erection before mating in males in waterfowl. Rather, intromission is accomplished by the evolution of the penis into the female reproductive tract. The erect penises of mammals and turtles are rigid hydrostats supported by axial-orthogonal layers of non-elongated collagen fibers. Unlike mammals and turtles, the penis of waterfowl is flexible when erect, suggesting that the collagen fibers will not be arranged in axial orthogonal arrays (Babinski et al. 2005, Kelly 2002). Partial and complete phallic prolapse is possible in birds with a large phallus and is usually secondary to local infection, trauma, and extreme weather changes. Excessive sexual desire and copulation, fecal contamination, and *Neisseria* spp. have been reported as causes of phallic infections (Krautwald et al. 2008). A prolapsed phallus can enlarge as well as become ulcerated and exacerbate the problem. The treatment includes that; if the tissue is thought to be still alive, the organ should be reduced in size and rejected. Before the phallus shrinks, it should be cleaned with dilute chlorhexidine and saline. For reposition, it is recommended to reduce the size of the phallus and apply a 50% dextrose solution to the phallus. The prolapsed phallus should be cleaned and necrotic tissues should be carefully debrided before applying reposition. Topical antibiotic ointments, dimethyl sulphoxide, and systemic antibiotics may be beneficial. Partial closure of the cloaca (via mattress or transcloacal suture) may be required to prevent a recurrence. Severe necrotic phallus may require surgical debridement. In case of the phallus is completely necrotic, total removing of the phallus tissue is recommended (Krautwald et al. 2008, Guzman 2016). The aim of this case report was to present the treatment of prolapsed phallus in a Pekin duck.

CASE HISTORY

A 7-month-old male Pekin duck was referred to Atatürk University Animal Hospital with the complaint of a mass under the abdomen. According to the information obtained from the patient's owner, the mass was repositioned and the suture was applied to the prepuce, but recurring was occurred. Its cause and how it occurred have not been fully reported by the patient owner. While no problems were observed in defecation and urination, there was a slight decrease in appetite. The prolapsed penis was approximately 8 cm long and the tissue integrity of the phallus was impaired. There were necrotic areas in the basis and body parts of the phallus and it had completely dried up and lost its vitality (Figure 1). As a result of physical examination, amputation was decided due to the excessive necrotic areas on the phallus. Sedation was achieved with 0.2 mg/kg i.m. diazepam (10 mg/2ml Deva, Turkey). 1 to 2 l/min of pure oxygen with a concentration of 7% sevoflurane (250 ml sevoflurane Liquid Abbott, Istanbul, Turkey) were administered with the oxygen mask for induction. After the induction, maintenance was provided with 200 ml/kg oxygen and 4-5% sevoflurane. Our patient was placed in the dorsoventral position the prolapsed phallus was cleaned with 0.5% chlorhexidine. The amputation process was performed on cut mode with electrosurgical monopolar cautery (EK160, Üzümcü, Ankara, Turkey). Lymphatic cisterns extending to the right and left (cisterna lymphatica basis phalli) fibrocartilage tissue of the phallus were cauterized without bleeding. The corpus part of the phallus was removed together with the glandular and cutaneous phallus sacs. Tissues were checked for hemorrhage and no evidence of bleeding was found (Figure 2). The necrotic phallus was successfully removed (Figure 3). After the amputation process was completed, topical Terramycin eye pomade 3.5 g (Pfizer, Istanbul) and 1% Silverdin (Deva Holding, Istanbul) were applied to the basic part of the phallus and the remained tissue was replaced into the cloaca. 150 mg/kg amoxicillin and 1 mg/kg meloxicam were prescribed to intramuscular for five postoperative days. At the end of the first postoperative day, no clinical abnormalities were observed, and duck started to eat normally. Although it was informed that no complications were informed by the owner on the 14th day following the surgery, the swelling and abscess were reported in the amputated penile tissue at the 1 month follow-up. After the abscess formation, duck was taken to another veterinary hospital and subjected to a medical treatment and was reported to be healthy at postoperative 2 month interview.



Figure 1. Pre-operative necrotic prolapsed phallus



Figure 2. The amputation process was performed with an electrocautery pen



Figure 3. Postoperative removed the necrotic phallus

DISCUSSION AND CONCLUSION

A prolapsed phallus due to frostbite in ostriches has been reported (Krautwald et al. 2008, Ritchie 1994). Birds with severe prolapse and infection can become significantly depressed and often lose interest in mating (Krautwald et al. 2008). In presented case, no decrease in sexual desire was informed. Once the phallus prolapsed, the organ can dry out and become necrotic if not repositioned (Krautwald et al. 2008, Guzman 2016). The prolapsed part of the phallus is cleaned with antiseptic solutions, and after the repositioning is achieved, the purse string suture is

placed over the cloaca (Ritchie 1994). In our case recurring of the prolapsed phallus was detected after the purse string suture. Necrotized phallus tissue was also noted in this case, so this tissue was extirpated with electrocautery. Previous reports have also stated that phallus should be removed if it is necrotic (Krautwald et al. 2008, Ritchie 1994). In conclusion, amputation of prolapsed phallus in ducks may be

accomplished by electrocautery. However, postoperative care is important to prevent complications such as abscess.

Ethics Committee Information: An ethics committee document is not required for this study.

Conflict of interest: The authors declare that there is no actual, potential or perceived conflict of interest for this article.

REFERENCES

- Brennan PL, Birkhead TR, Zyskowski K, Van Der Waag J, Prum RO.** Independent evolutionary reductions of the phallus in basal birds. *Journal of Avian Biology.* 2008; 39(5): 487-92.
- Briskie JV, Montgomerie R.** Sexual selection and the intromittent organ of birds. *Journal of Avian Biology.* 1997; 28: 73-86.
- McCracken KG, Wilson RE, McCracken PJ, Johnson KP.** Are ducks impressed by drakes' display?. *Nature.* 2001; 413(6852): 128-128.
- Gilbert AB, King AS, and J. McLelland.** Form and function in birds. Volume 1, Academic Press, Cambridge, UK. 1980; pp. 237-360.
- Jamieson, Barrie GM.** Reproductive biology and phylogeny of birds. 1st edition, CRC Press, Florida, USA. 2011; pp. 1-115.
- Brennan PL, Christopher JC, Richard OP.** Explosive eversion and functional morphology of the duck penis supports sexual conflict in waterfowl genitalia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2010; 277(1686): 1309-1314.
- Babinski M, deBrito-Gitirana L, Chagas M, Figueiredo MA, Costa W, Sampaio F.** Immunohistochemical analysis of smooth muscle cells and volumetric density of the elastic system fibers of wild boar (*Sus scrofa*) penis. *Animal reproduction science.* 2005; 86(3-4): 317-28.
- Kelly D.** The functional morphology of penile erection: tissue designs for increasing and maintaining stiffness. *Integrative and Comparative Biology.* 2002; 42(2): 216-21.
- Krautwald M, Orosz SE, T Tully Jr.** Essentials of avian medicine and surgery. 3rd edition, John Wiley & Sons, New York, USA. 2007; pp. 124-208.
- Guzman DSM.** Avian soft tissue surgery. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice.* 2016; 19(1): 133-157.
- Ritchie BW.** Avian medicine principles and application. Wings Publishing, Florida, USA. 1994; pp. 1096-1132.

Aelurostrongylus abstrusus Infection and Radiographic Findings in a Kitten

Ersoy BAYDAR¹, Feyyaz KAYA^{1*}

¹Balikesir University, Veterinary Faculty, Department of Internal Diseases, Balikesir, Turkey

ABSTRACT

A two-month-old female kitten suffering from respiratory signs, lethargy, and anorexia for fifteen days was brought to Balikesir University Small Animal Internal Medicine Clinics of Veterinary Faculty. During pulmonary auscultation, stridor in the cranial pulmonary lobes was detected. Laterolateral and ventrodorsal radiographs were obtained. A live larva of *Aelurostrongylus abstrusus* was also detected in the patient's direct fecal smear. The patient had recovered after treated with suitable antibiotics and anthelmintics. The parasite is determined in young adults or older cats, and it can cause serious infection. It can cause serious radiological findings in the lungs in kittens besides clinical symptoms. In conclusion, a differential diagnosis list in kittens that have dyspnea and serious pulmonary radiological findings must involve *A. abstrusus* infection.

Keywords: *Aelurostrongylus abstrusus*, kitten, nematoda, thorax radiography

Bir Yavru Kedide *Aelurostrongylus abstrusus* Enfeksiyonu ve Radyografik Bulgular

ÖZ

Balikesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Küçük Hayvan İç Hastalıkları Kliniği'ne Kliniği'ne 15 gündür solunum bulguları, uyuşukluk ve iştahsızlık şikayeti olan iki aylık dişi yavru kedi getirildi. Pulmoner oskültasyon sırasında, kraniyal pulmoner loblarda stridorlar tespit edildi. Hastanın laterolateral ve ventrodorsal radyografileri çekildi. Hastanın direkt dışkı yaymasında da canlı bir *Aelurostrongylus abstrusus* larvası tespit edildi. Hasta, uygun antibiyotik ve antelmintiklerle tedavi edildikten sonra iyileşti. Genç yetişkinlerde veya yaşlı kedilerde belirlenen parazit ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Ayrıca kedilerde klinik semptomların yanı sıra akciğerlerde ciddi radyolojik bulgulara neden olabilir. Sonuç olarak, nefes darlığı ve akciğerlerinde ciddi radyolojik bulguları olan yavru kedilerde ayırıcı tanı listesi *A. abstrusus* enfeksiyonunu içermelidir.

Anahtar Kelimeler: *Aelurostrongylus abstrusus*, nematod, toraks radyografisi, yavru kedi

To cite this article: Baydar E, Kaya F. Case Report: *Aelurostrongylus abstrusus* Infection and Radiographic Findings in a Kitten. Kocatepe Vet J. (2021) 14(2): 278-283

Submission: 21.04.2021 Accepted: 23.05.2021 Published Online: 30.05.2021

ORCID ID; : EB: 0000-0002-2565-1796 FK: 0000-0001-8820-1509

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

INTRODUCTION

Aelurostrongylus abstrusus (Nematoda, Strongylida) lungworm is a common parasite that infects cats worldwide (Anderson 2000). The life cycle of the parasite is indirect. Many species of snails have been considered globally as intermediate hosts (Lopez et al. 2015). Cats get infected via ingesting intermediate or paratenic hosts like lizards, birds, snakes, rodents, frogs, etc. (Anderson 2000, Hobmaier and Hobmaier 1935).

After the ingestion of the eggs, the parasite reaches its sexual maturity in about four weeks. Adult stages of the parasite live in the terminal respiratory bronchioles and alveolar ducts of the definitive host. Following mating, female parasites produce eggs, and the embryos complete their maturation within the pulmonary ducts and alveoli. When the larvae are hatched, they are swallowed by the cat and released into the environment by feces (Anderson 2000).

Adult parasites, production of eggs, migration of larvae can cause mild to heavy granulomatous or mixed inflammatory response in *A. abstrusus* infection (Dennler et al. 2013). Clinical manifestations depend on several factors such as age, health status, immune response, and worm burden (Elsheikha et al. 2016). The infection can limit itself, and respiratory signs may resolve within several weeks (Traversa et al. 2010). The most frequent respiratory symptoms are mild to severe coughing, sneezing, wheezing, dyspnoea, nasal discharge, and tachypnoea (Traversa et al. 2008a, 2008b). In addition, generalized signs such as weight loss and lethargy are also described (Grandi 2005). Severe respiratory and cardiovascular manifestations, such as labored breath, tachycardia, and even sudden death, may occur in young cats with immunosuppression (Pechman 1984). Furthermore, it is suggested that nearly 10% of cats dying during or post anesthesia were suffered from by *A. abstrusus* infections (Gerdin et al. 2011). There are no pathognomonic features in radiological examination related to aelurostrongylosis. Alveolar, bronchial, and interstitial patterns are observed. However, the severity of the bronchial wall thickening and interstitial opacity increase in the lungs can be change depending on the chronicity of the infection and worm burden (Losonsky et al. 1983, Mahaffey 2005).

A. abstrusus L1 can be diagnosed via direct fecal smear, coprological examination, and Baermann method (Grandi 2005). Immunofluorescence antibody technique and PCR technique have been used in the diagnosis of the parasite (Amnoscia et al. 2014, Briggs et al. 2013). However, ELISA is using

more commonly in recent years diagnosing the parasite (Zottler et al. 2017).

In the literature, several duration and dosage procedures that contain fenbendazole have been described for treatment; such as 20 mg/kg per b.w., orally for 5 days and up to 50 mg/kg per b.w., orally for 15 days. On the other hand, some researchers have reported that ivermectin was not clear the infection in the cats efficiently (Kirkpatrick and Megella 1987).

CASE HISTORY

A two-month-old female kitten suffering from dyspnea, lethargy, and anorexia for fifteen days was brought to Balikesir University Small Animal Internal Medicine Clinics of Veterinary Faculty. The animal was treated once against external parasites but not vaccinated. It came with an anamnesis of intermittently coughing that is without being associated with tiredness. In the last days, an increased frequency and duration of the neurological seizures were explained by the owner. Dyspnea, tachycardia (250 bpm), tachypnea (45 bpm), slightly cyanotic mucous membranes, emaciation, lethargy, and poor haircoat were observed during clinical examination of the patient. The patient's fever was not high (39 °C). During pulmonary auscultation, stridor was detected in the cranial pulmonary lobes. Laterolateral and ventrodorsal radiographs were obtained (images 2, 3). A live larva of *A. abstrusus* was also detected in the patient's direct fecal smear (image 1). For the treatment of the infection 50 mg/kg/ b.w. SID, fenbendazole (Aniprazol KK) was administered orally for 15 days. Moxidectin (Heuer et al. 2020) and eprinomectin (Knaus et al. 2014) are effective and useful to treat Aelurostrongylosis. However, according to our search, there is no suitable form in Turkey these drugs for cats, so fenbendazole was selected for the treatment. To improve the overall condition, additional non-specific therapy dexamethasone (Vetakort© 4 mg) at a dose of 0.1 mg/kg b.w., intramuscularly 3 times per 48 hours, ampiciline (Ampisina©, 250 mg / 1 flacon) at a dose of 10 mg/kg b.w., intramuscularly per 24 hours for 5 days were administered. At the end of the treatment, the cat owner reported that the cat had recovered.



Image 1: *Aelurostrongylus abstrusus* larva. (40x)

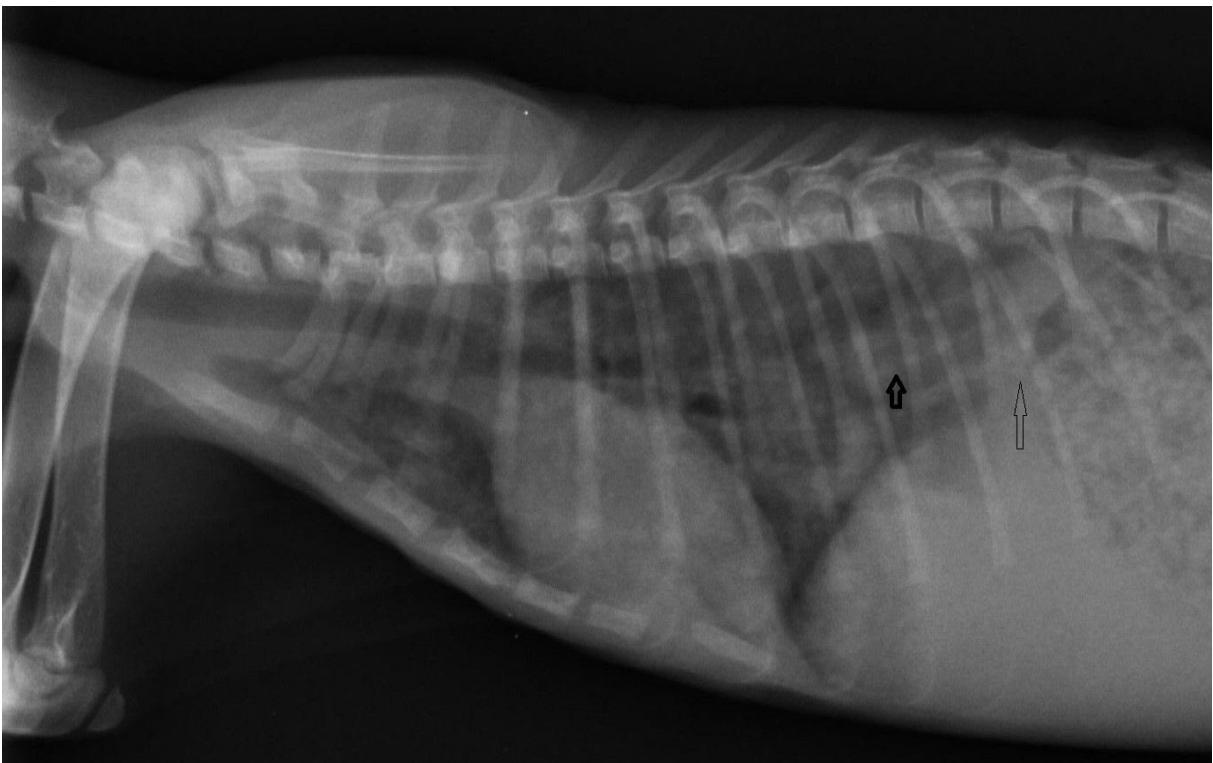


Image 2: Unstructural interstitial pattern (bold arrow); alveolar pattern (thin arrow).

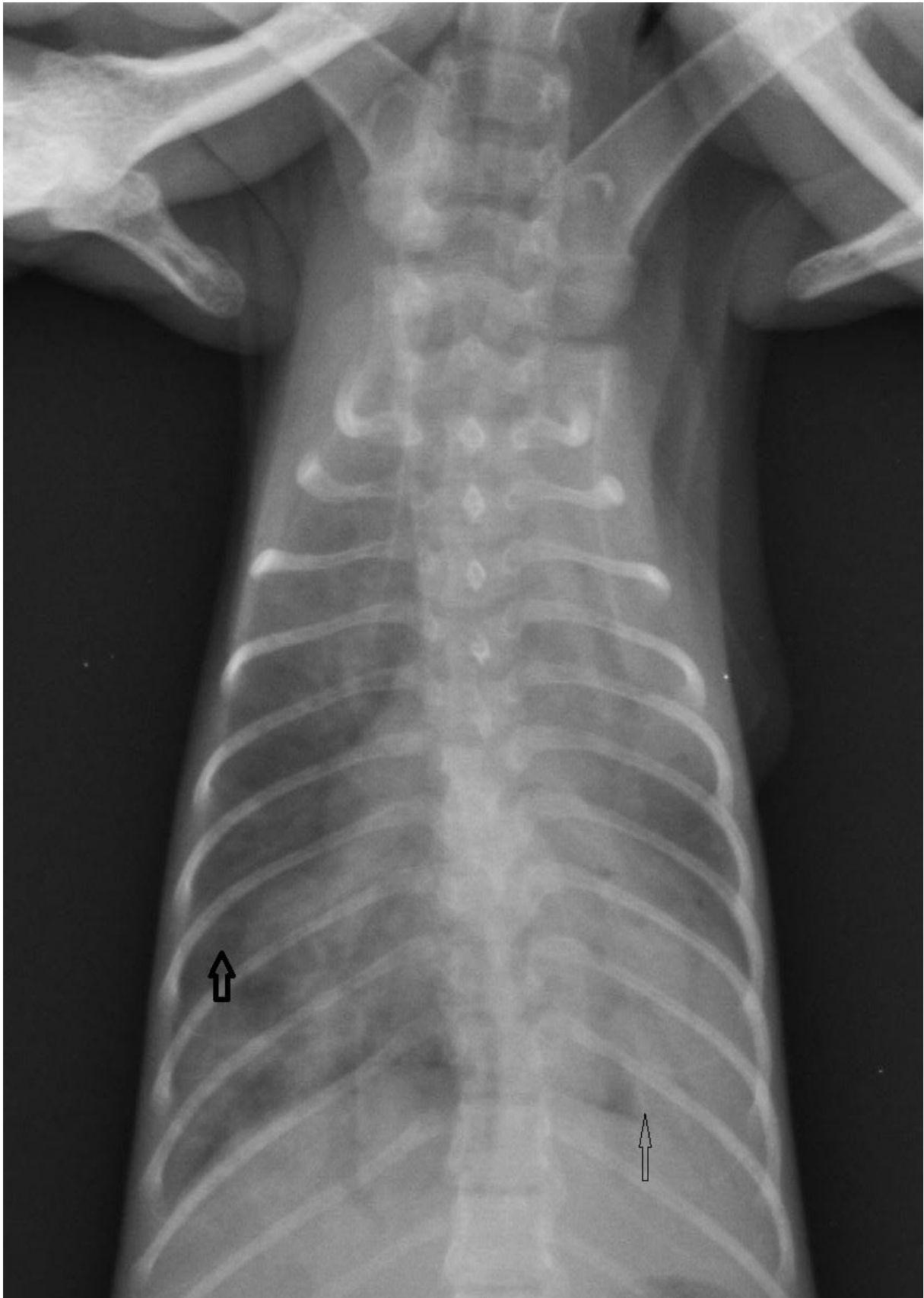


Image 3: Unstructural interstitial pattern (bold arrow); alveolar pattern (thin arrow).

A. abstrusus is a lungworm parasite that infects cats globally (Anderson 2000). The infection caused by the parasite was reported from several countries of Europe and Turkey (Atasever and Yazar 2009, Burgu and Sarımehtemetoğlu 2004, Grandi 2005, Tüzer et al. 2002, Traversa et al. 2008b, Yildiz et al. 2011). Our physical examination findings such as dyspnea, tachycardia, poor hair coat, emaciation and lethargy and radiographic findings such as alveolar pattern, unstructured interstitial pattern, increased bronchial wall thickness and increased opacity of all lung lobes are consistent with previous reports (Elsheikha et al. 2016, Grandi et al. 2005, Losonsky 1983, Mahaffey 2005, Traversa et al. 2008a 2008b, Tüzer et al. 2002). Feline aelurostrongylosis can be easily confused with other diseases of the respiratory system and due to the infection similar clinical, radiographic, and hematological findings can be observed. (Foster et al. 2004a 2004b, Holmes et al. 1993). However, most of the research articles and case reports about the parasite include young or young adult cats that ages generally change between 1 to 3 years old. Although many developed techniques are used to diagnose the parasite (Annoscia et al. 2014, Briggs et al. 2013, Zottler et al. 2017) in this case report, there was no need to use specific diagnostic methods after confirming the species of the parasite.

According to our literature search, only just one publication reported that the parasite has been determined in a 3.5 months old kitten (Burgu and Sarımehtemetoğlu, 2004). As stated before, in most cats, non-specific pulmonary findings such as diffuse interstitial pulmonary pattern, bronchial, or alveolar pulmonary pattern were observed. It is important to note that, in this case report, the kitten was only 2 months old, and besides increased bronchial wall thickness and alveolar pattern that is considered non-specific for lung parasites; it had severe pulmonary radiological findings include caudodorsally located unstructured interstitial pulmonary pattern which is considered specific for lung parasites.

In conclusion, *A. abstrusus* rarely been reported from Turkey, especially in kittens. So this case report is important in terms of epidemiology and diagnosis of the parasite, and the infection caused by the parasite should be involved in the differential diagnosis list in kittens that have respiratory distress syndrome.

Conflict of Interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

Ethics Committee Approval

In accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees," this study does not require HADYEK's permission.

- Anderson RC.** The superfamily Metastrongyloidea. In: Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission, 2nd ed, CABI Publishing, Guilford. 2000; pp. 163–164.
- Annoscia G, Latrofa MS, Campbell BE, Gianelli A, Ramos RAN, Dantas-Torres F, Brianti E, Otranto D.** Simultaneous detection of the feline lungworms *Troglostrongylus brevior* and *Aelurostrongylus abstrusus* by a newly developed duplex-PCR. *Veterinary Parasitology*. 2014; 199: 172–178.
- Atasever A, Yazar S.** *Aelurostrongylus abstrusus* Pneumonia in an Immunosuppressed Cat. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 2009; 33: 89 – 91.
- Barrs VR, Swinney GR, Martin P, Nicoll RG.** Concurrent *Aelurostrongylus abstrusus* infection and salmonellosis in a kitten. *Australian Veterinary Journal*. 1999; 77: 229–232.
- Blagburn BL, Hendrix CM, Lindsay DS, Vaughan JL.** Anthelmintic efficacy of ivermectin in naturally parasitized cats. *American Journal of Veterinary Research*. 1987; 48: 670–672.
- Burgu A, Sarımehtemetoğlu O.** *Aelurostrongylus abstrusus* infection in two cats. *Veterinary Record*. 2004; 154: 602-604.
- Briggs KR, Yaros JP, Liotta JL, Lucio-Foster A, Lee AC, Bowman DD.** Detecting *Aelurostrongylus abstrusus*-specific IgG antibody using an immunofluorescence assay. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2013; 15: 1114–1118.
- Dennler M, Bass DA, Gutierrez-Crespo B, Schnyder M, Guscetti F, DiCesare A, Deplazes A, Kircher PR, Glaus TM.** Thoracic Computed Tomography, Angiographic Computed Tomography, And Pathology Findings In Six Cats Experimentally Infected With *Aelurostrongylus abstrusus*. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 2013; 54, 459–469.
- Elsheikha HM, Schnyder M, Traversa D, Di Cesare, A, Wright I, Lacher DW.** Updates on feline aelurostrongylosis and research for the next decade. *Parasitological Vectors*. 2016; 9: 389.
- Foster SF, Martin P, Allan GS, Barrs, VR, Malik R.** Lower respiratory tract infections in cats: 21 cases (1995–2000). *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2004a. 6: 167–180.
- Foster SF, Martin P, Braddock JA, Malik R.** A retrospective analysis of feline bronchoalveolar lavage cytology and microbiology (1995–2000). *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2004; 6: 189–198.
- Gerdin JA, Slater MR, Makolinski KV, Looney AL, Appel LD, Martin NM, McDonough SP.** Post-Mortem Findings in 54 Cases of Anesthetic Associated Death in Cats from Two Spay—Neuter Programs in New York State. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2011; 13: 959-966.

- Grandi G, Calvi LE, Venco L, Paratici C, Genchi C, Memmi D, Kramer LH.** *Aelurostrongylus abstrusus* (cat lungworm) infection in five cats from Italy. *Veterinary Parasitology*. 2005; 134: 177–182.
- Heuer L, Petry G, Pollmeier, M. Schaper R, Deuster K, Schmidt H, Katrin Blazejak, Strube C, Di Cesare A, Traversa D, Schnyder M, McKay-Demeler, Himmelstjerna GS, Mangold-Gehring S, Böhm C.** Efficacy of imidacloprid 10%/moxidectin 1% spot-on formulation (Advocate®) in the prevention and treatment of feline aelurostrongylosis. *Parasites Vectors*. 2020; 13, 65.
- Hobmaier M, Hobmaier A.** Intermediate Hosts of *Aelurostrongylus abstrusus* of the Cat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1935; 32: 1641–1647.
- Holmes RA.** Feline Dirofilariosis. *Veterinary Clinics North America Small Animal Practice* 1993; 23: 125–138.
- Kirkpatrick CE, Megella C.** Use of ivermectin in treatment of *Aelurostrongylus abstrusus* and *Toxocara cati* infections in a cat. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 1987; 190: 1309–1310.
- Martin Knaus, S.** Theodore Chester, Joseph Rosentel, Axel Kühnert, Steffen Rehbein.
- Efficacy of a novel topical combination of fipronil, (S)-methoprene, eprinomectin and praziquantel against larval and adult stages of the cat lungworm, *Aelurostrongylus abstrusus*, *Veterinary Parasitology*, 2014; 202: 64–68.
- López C, Panadero R, Paz A, Sanchez-Andrade R, Diaz P, Diez-Paños P, Morrondo P.** Larval development of *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda, Angiostrongylidae) in experimentally infected *Ceratomyxa (Ceratomyxa) virgata* (Mollusca, Helicidae). *Parasitological Research*. 2005; 95: 13–16.
- Losonsky JM, Thrall DE, Prestwood AK.** Radiographic evaluation of pulmonary abnormalities after *Aelurostrongylus abstrusus* inoculation in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 1983; 44: 478–482.
- Mahaffey MB.** Radiographic-Pathologic Findings In Experimental *Aelurostrongylus abstrusus* Infection In Cats. *Veterinary Radiology*. 2005; 20: 81.
- Pechman RD.** Newer Knowledge of Feline Bronchopulmonary Disease. *Veterinary Clinics North America Small Animal Practice* 1984; 14: 1007–1019.
- Taubert A, Pantchev N, Vrhovec MG, Bauer C, Hermosilla C.** Lungworm infections (*Angiostrongylus vasorum*, *Crenosoma vulpis*, *Aelurostrongylus abstrusus*) in dogs and cats in Germany and Denmark in 2003–2007. *Veterinary Parasitology* 2009; 159: 175–180.
- Traversa D, Cesare A, Di Milillo P, Iorio R, Otranto D.** *Aelurostrongylus abstrusus* in a feline colony from central Italy : clinical features, diagnostic procedures and molecular characterization. *Parasitological Research*. 2008a; 103: 1191–1196.
- Traversa D, Di Cesare A, Conboy G.** Canine and feline cardiopulmonary parasitic nematodes in Europe: Emerging and underestimated. *Parasitological Vectors*. 2010 3, 1–22.
- Traversa D, Lia RP, Iorio R, Boari A, Paradies P, Capelli G, Avolio S, Otranto D.** Diagnosis and risk factors of *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda, Strongylida) infection in cats from Italy. *Veterinary Parasitology* 2008b; 153: 182–186.
- Tüzer E, Toparlak M, Gargili A, Keleş V, Esatgil M.** A case of *Aelurostrongylus abstrusus* infection in a cat in İstanbul, Turkey and its treatment with moxidectin and levamisole. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2002; 26: 411–414.
- Yildiz K, Duru SY, Gokpinar S.** Alteration in blood gases in cats naturally infected with *Aelurostrongylus abstrusus*. *Journal of Small Animal Practice*. 2011; 52: 376–379.
- Willard MD, Roberts RE, Allison N, Grieve RB, Escher K.** Diagnosis of *Aelurostrongylus abstrusus* and *Dirofilaria immitis* infections in cats from a human shelter. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 1988; 192: 913–916.
- Zottler EM, Strube C, Schnyder M.** Detection of specific antibodies in cats infected with the lung nematode. *Aelurostrongylus abstrusus* *Veterinary Parasitology*. 2017; 235: 75–82.

Instruction for Authors

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

References

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

Journal:

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

Book section:

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

Web page:

Anonymous. http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&cust_id=13;Accessien date: 02.01.2012.

Thesis:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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