

ISSN 1016-3573 • e-ISSN 2717-8099



**VETERİNER KONTROL MERKEZ
ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**
Etlik - ANKARA



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY

Cilt/Volume 32 ♦ Sayı/Issue 1 ♦ 2021

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Journal of Etlik Veterinary Microbiology

Cilt/Volume 32 ♦ Sayı/Issue 1 ♦ 2021

Yılda iki kez yayımlanır (Haziran-Aralık) / *Published two times per year (June-December)*

Yaygın süreli ve hakemli / *Peer-reviewed and published regularly*

Türkçe ve İngilizce / *Turkish and English*

ISSN 1016-3573 • e-ISSN 2717-8099

Sahibi / Owner

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Adına
On behalf of the Veterinary Control Central Research Institute

Dr. Cevdet Yaralı

Enstitü Müdür V. / *Director*

Yayın Kurulu / Publication Board

Sorumlu Yazı İşleri Müdürü / Managing Editor

Özcan Yıldırım

Editör / Editor in Chief

Dr. Erdem Danyer

Dr. Selçuk Pekkaya

Dil Editörleri / Copy Editors

Dr. Yeliz YIKILMAZ

Dr. F. İpek KESKİN

Bilimsel Kurul* / Editorial Board

Dr. Erhan Akçay

Dr. Özlem Altıntaş

Dr. Ali Erkurt

Dr. Sabri Hacıoğlu

Uzm. Yusuf Ziya Kaplan

Uzm. Bahadır Kılınc

Çağla Korkmaz

Doç. Dr. Burhan Toprak

Neslihan Akbulut Tosun

* Kurullar soyada göre alfabetik dizilmiştir
Boards are listed alphabetically by surname

Danışma Kurulu / Advisory Board

Ertan AĞTÜRK, Foot and Mouth Disease Inst., Ankara, Turkey

Dr. Ayşe ATEŞOĞLU, Pendik Vet. Cont. Inst., İstanbul, Turkey

İsmail AYDIN, Samsun Vet. Cont. Inst., Samsun, Turkey

Dr. Martin BACHMANN, Martin Luther Uni., Halle, Germany

Prof. Dr. Tanay BİLAL, İstanbul Uni., İstanbul, Turkey

Dr. Erdim Ozan ÇAKIR, Pendik Vet. Cont. Inst., İstanbul, Turkey

Doç. Dr. Fethiye ÇÖVEN, Bornova Vet. Cont. Inst., İzmir, Turkey

Dr. Müge DOĞAN, Konya Vet. Cont. Inst., Konya, Turkey

Dr. Aysel EKİNCİ, Vet. Cont. Inst., Elazığ, Turkey

Yasemin ERDOĞAN, Erzurum Vet. Cont. Inst., Erzurum, Turkey

Dr. Ufuk EROL, Cumhuriyet Uni., Sivas, Turkey

Dr. Yasin GÜLCÜ, Konya Vet. Cont. Inst., Konya, Turkey

Prof. Dr. Tolga GÜVENÇ, Ondokuz Mayıs Uni., Samsun, Turkey

Prof. Dr. Murat GÜZEL, Ondokuz Mayıs Uni., Samsun, Turkey

Bünyamin İREHAN, Elazığ Vet. Cont. Inst., Elazığ, Turkey

Dr. Günel İSMAİLOVA, Independent Consultant, Rome, Italy

Dr. Hamza KADI, Samsun Vet. Cont. Inst., Samsun, Turkey

Mehmet KARAKAYA, Foot and Mouth Disease, Ankara, Turkey

Ünal KILIÇ, Elazığ Vet. Cont. Inst., Elazığ, Turkey

Dr. Emre OZAN, Ondokuz Mayıs Uni., Samsun, Turkey

Dr. Ediz Kağan ÖZGEN, Erzurum Vet. Cont. Inst., Erzurum, Turkey

Dr. Giulia RONCON, Utrecht Uni., Utrecht, The Netherlands

Dr. Fahriye SARAÇ, Pendik Vet. Cont. Inst., İstanbul, Turkey

Osman SEZER, Adana Vet. Cont. Inst., Adana, Turkey

Mehmet Ali SÖZMEN, Adana Vet. Cont. Inst., Adana, Turkey

Dr. Özhan TÜRKYILMAZ, Bornova Vet. Cont. Inst., İzmir, Turkey

Prof. Dr. A.Erdem ÜTÜK, Çukurova Uni., Adana, Turkey

Prof. Dr. Ender YARSAN, Ankara Uni., Ankara, Turkey

Prof. Dr. Yeliz YILDIRIM, Erciyes Uni., Kayseri, Turkey

Adres / Address : Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No 21/21-A 06020
Etlik - Ankara / TÜRKİYE Tel. : +90 312 326 00 90 (8 hat) Faks : +90 312 321 17 55

E-posta : etlikdergi@tarimorman.gov.tr

İnternet adresi : <https://vetkontrol.tarimorman.gov.tr/merkez> - <https://dergipark.org.tr/tr/pub/evmd>

Hakem Listesi* / *Reviewer List*

Doç. Dr. Levent ALTINTAŞ	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD.
Doç. Dr. Zeki ARAS	Aksaray Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Doç. Dr. Mehmet Fatih AYDIN	Karamanoğlu Mehmet Bey Üniv. Sağlık Bilimleri Fakültesi
Prof. Dr. Tanay BİLAL	İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Veteriner Fak. Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları AD.
Dr. Öğretim Üyesi Duygu BUDAK	Aksaray Üniv. Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları AD.
Doç. Dr. Fatih BÜYÜK	Kafkas Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Prof. Dr. Mehmet ÇABALAR	Harran Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
Doç. Dr. Özgür ÇADIRCI	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi AD.
Dr. Öğretim Üyesi Nebi ÇETİN	Van Yüzüncü Yıl Üniv. Veteriner Fakültesi Klinik Bilimleri Bölümü
Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ	Ondokuz Mayıs Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Doç. Dr. Hüsammettin EKİCİ	Kırıkkale Üniv. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD.
Dr. Seda EKİCİ	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Gıda Kontrol Laboratuvarı
Dr. Aysel EKİNCİ	Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Parazitoloji Laboratuvarı
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD.
Doç. Dr. Veli GÜLYAZ	Harran Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
Doç. Dr. Elçin GÜNAYDIN	Kastamonu Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Prof. Dr. Mehmet HALIGÜR	Çukurova Üniv. Ceyhan Veteriner Fakültesi Patoloji AD.
Prof. Dr. Sinan İNCE	Afyon Kocatepe Üniv. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD.
Yusuf Ziya KAPLAN	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Gıda Kontrol Laboratuvarı
Dr. Derya KARATAŞ YENİ	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yetiştirme Hast. Lab.
Dr. Öğretim Üyesi Burcu KARAGÜLLE	Fırat Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Doç. Dr. Fadime KIRAN	Ankara Üniv. Fen Fakültesi/ Biyoloji Bölümü/ Moleküler Biyoloji AD.
Doç. Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Dr. Ediz Kağan ÖZGEN	Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Doç. Dr. Aslı SAKMANOĞLU	Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Dr. Öğretim Üyesi Sedat SEVİN	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji AD.
Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK	Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi Viroloji AD.
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI	Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.
Dr. Öznur YAZICIOĞLU	Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Patoloji Laboratuvarı
Prof. Dr. Yakup YILDIRIM	Mehmet Akif Ersoy Fakültesi Veteriner Fakültesi Viroloji AD.

** İsimler soyada göre alfabetik dizilmiştir ve bu sayıda görev alanlar yazılmıştır.
Names are listed alphabetically by surname and this issues reviewers are written.*

ULAKBİM Yaşam Bilimleri, Türkiye Atıf Dizini, EBSCO, CAB Abstracts, AGRIS, Asos Index veritabanları kapsamında bulunan DergiPark'da açık erişim olarak yayın yapan, "en az çift hakemli" bir dergidir.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology is an open access journal, that evaluated by at least two double-blind reviewers and indexing in the scope of ULAKBİM life sciences, Turkish citation index, CAB abstracts and publishes scientific articles open access on DergiPark databases and.

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2021, Her hakkı saklıdır. / *All rights reserved.*

Basım Tarihi / *Publishing Date*: Haziran / June 2021, Baskı adedi / *Circulation*: 500

Tasarım ve Baskı / *Designed and Pressed by*



Medisan Yayinevi Ltd.Şti.

Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye

Tel : +90 312 311 24 26 – 311 00 57 medisan yayinevi@gmail.com

İçindekiler / Contents

Original Article / Özgün Araştırma

Invitro decontamination effect of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on important foodborne pathogens	
Çinko oksit nanopartiküllerin (ZnO-NP) önemli gıda kaynaklı patojenler üzerine in vitro dekontaminasyon etkisi	
Tahsin Onur Kevenk, Ahmet Koluman	1
Isolation and antimicrobial susceptibility of <i>Streptococcus canis</i> from dogs	
Köpeklerden <i>Streptococcus canis</i> 'in izolasyonu ve antimikrobiyal duyarlılığı	
Ezgi Şababoğlu, Dilek Oztürk, Hülya Turutoğlu	6
Production of polyclonal antibodies against Turkey FMDV strains	
Türkiye'de Şap virüsü şuşlarına karşı poliklonal antikor üretimi	
Beyhan Sareyyüpoğlu.....	14
Pathogen isolation and antibiogram analysis in dairy cows with clinical mastitis in Adana region, Turkey	
Türkiye, Adana bölgesindeki klinik mastitisli sütçü ineklerde patojen izolasyonu ve antibiyogram	
Serdal Kurt, Funda Eşki	20
First molecular detection of Canine Hemoplasmas in Sivas province in central part of Turkey	
Sivas ilinde Canine Hemoplasma'nin ilk moleküler tespiti	
Ufuk Erol, Kürşat Altay, Ahmet Duran Ataş, Ömer Faruk Şahin, Osman Furkan Urhan	27
Investigation of ruminant encephalitic and septicemic listeriosis by the immunofluorescence method	
Ruminantların ensefalitik ve sepsisemik listeriyozisinin immunfloresan metotla araştırılması	
Emin Karakurt, Serpil Dağ, Enver Beytut, Özhan Karataş, Hilmi Nuhoğlu, Ali Sefa Mendil, Ayfer Yıldız	33
Development of real-time PCR method for the diagnosis of <i>Mycoplasma gallisepticum</i> and <i>Mycoplasma synoviae</i>	
<i>Mycoplasma gallisepticum</i> ve <i>Mycoplasma synoviae</i> teşhisi için real-time PCR yöntemi geliştirilmesi	
İnci Başak Müştak, Mustafa Kolkurkırık.....	40
Türkiye'de Doğu Akdeniz illerindeki süt keçisi işletmelerinde pestivirus enfeksiyonlarının seroprevalansı	
Seroprevalance of pestivirus infections in dairy goat farms in Eastern Mediterranean, Turkey	
Fırat Doğan, Veysel Soydal Ataseven, Yaşar Ergün.....	45

Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan süt örneklerinde bazı metal düzeyleri

Some metal levels in milk samples which were collected from different regions of Turkey

Erdim Ozan Çakır, Ender Yarsan..... 50

Rodentlerde yaygın bir zoonotik etken: BartonellaA common zoonotic agent in rodents: *Bartonella*

Derya Karataş Yeni..... 63

Review Article / Derleme

***Lactobacillus buchneri*'nin silajdaki eşsiz etkinliği**The unique activity of *Lactobacillus buchneri* in silage

Mustafa Önel, İmge Duru Önel..... 69

Veteriner sahada güncel mikrobiyota kavramı

Current microbiota concept in veterinary medicine

Emre Küllük, Duygu Dalğın 77

Yaban hayvanlarında antikoagülan rodentisitler ile zehirlenmeler

Anticoagulant rodenticide poisoning in wild animals

Orhan Tokur, Abdurrahman Aksoy..... 89

Resmi gıda kontrollerinde Covid-19 tedbirlerine yönelik ilave gereklilikler

Sibel Özçakmak..... 99

Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayım Koşulları

1. Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanacak metinler 12 pt, Times New Roman yazı karakterinde, iki yana yaslanmış düz metin olarak, tüm kenarlarda 25 mm boşluk bırakılarak ve tek aralıklı sayfa düzeninde A4 (210 × 297 mm) boyutunda yazılmalıdır. Yazıların tamamı, şekil ve tablolar dahil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalarda 16, derlemelerde 10, olgu sunumlarında ve kısa bildirilerde 6 ve editöre mektuplarda 4 sayfayı kaynaklar hariç geçmemesi istenir.

2. *.doc ve *.docx biçimindeki metin ile en az 300 dpi çözünürlükteki *.jpeg veya *.tiff biçimindeki şekillerin ve tabloların tamamı DergiPark üzerinden gönderilmelidir.

Başvuru sırasında sunulacak dosyalar:

a. Başlık sayfası:

3. Yazı tipi (orijinal araştırma, güncel/davetli derleme, olgu sunumu, kısa bildiriler, editöre mektup) belirtilir.

4. Konuyu özetleyen kısa başlık yazılır. On kelimeyi geçmemesi önerilir.

5. Tüm yazarların adlarının ilk harfleri ve soyadlarının tümü büyük olacak şekilde yazıldıktan sonra üst simge ile numaralandırılarak çalıştıkları kurum ve adres bilgileri verilmelidir. Adreslerde şehir ve ülke adları belirtilmelidir. ORCID numarası verilmesi zorunludur. ORCID numaraları harflerle belirtilerek adreslerden sonra yazılabilir.

6. Sorumlu yazar "*" ile belirtilerek açık adres satırlarından sonra açık adres, telefon, e-posta bilgilerine yer verilmelidir. Kurum bilgileri birden başlayarak numaralandırılıp, adres, şehir, ülke bilgisi yazar isimleri altına eklenmelidir. Bu sayfada "sorumlu yazar" belirtilmeli isim, açık adres, telefon ve e-posta bilgileri eklenmelidir. Örnek olarak;

Farelerde Papilla Filiformislerin Işık ve Taramalı Elektron Mikroskopik Yapısı

Burhan Toprak^{1,a,*}

¹Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Genetik Laboratuvarı, 06020, Ankara, Türkiye

^aORCID: 0000-0003-1082-4559

*burhan.toprak@tarimorman.gov.tr, Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No: 23-1 06200, Keçiören-Ankara Tel: +903123254826

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler: İlgili kararlara ilişkin bilgiler (Alındığı kuruluş, tarih ve sayı) bu başlık altında verilmelidir.

Teşekkürler: kısmı başlık sayfasında yer almalıdır. Daha önce kongrelerde sunulan her çeşit bildirinin, başlık sayfasında kongre adı, yer ve tarih verilerek belirtilmelidir,

Maddi destek ve çıkar ilişkisi: Makale sonunda varsa çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi ve kuruluşlar ve varsa bu kuruluşların yazarlarla olan çıkar ilişkileri belirtilmelidir. (Olmaması durumu da "Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkara dayalı ilişkisi yoktur" şeklinde yazılmalıdır.

b. Makalenin ana metini:

7. Başlık, özet ve en çok beşer adet anahtar kelime, Türkçe ve İngilizce olarak, ana metin ve kaynaklarla birlikte Başlık sayfasından ayrı bir dosya olarak sisteme yüklenmelidir.

8. Orijinal bilimsel araştırmalarda, olgu sunumlarında ve kısa bildirilerde Türkçe ve İngilizce başlık, özet ve en az beş adet anahtar sözcük, giriş, gereç ve yöntem, bulgular, tartışma ve sonuç, kaynaklar sırası ile hazırlanmalıdır. Olgu sunumlarında olgu geçmişi kısmı da oluşturulabilir.

9. Tablo ve şekiller hem ayrı olarak sisteme yüklenmeli hem de yazı içinde olması gereken yere yerleştirilmelidir.

10. Oluşturulan bu ana metin dosyasında kesinlikle yazar adı, kurum, e-posta bilgisi vb. detaylar olmaması gerekmektedir. Tüm satırlara sürekli olarak devam eden numara verilmelidir.

11. **Özet,** Türkçe ve İngilizce olarak, tek paragraf halinde en fazla 250 sözcük olmalıdır.

12. **Anahtar kelimeler,** makale içeriğine uygun olarak seçilmeli, alfabetik sıraya göre yazılmalı ve beş sözcüğü geçmemelidir.

13. **Giriş,** konu ile ilgili özet literatür bilgisi içermeli, son paragrafında çalışmanın amacı vurgulanmalıdır.

14. **Gereç ve Yöntem,** ayrıntıya girmeden, anlaşılır biçimde yazılmalıdır. İstenilirse alt başlık kullanılabilir. Alt başlıklar italik yazı tipiyle belirtilmelidir. (Ekstraksiyon işlemi, istatistiksel yöntem, Deney deseni vb.)

15. **Bulgular,** bölümünde veriler, tekrarlama yapmadan açık bir şekilde belirtilmelidir. Bulgular tablo ve şekillerle desteklenerek kısa olarak sunulmalıdır. Tablo başlıkları tablonun üstünde, şekil ve grafik başlıkları ise şeklin altında belirtilmelidir. Tablo ve şekillerin kodlanması nümerik veya alfa nümerik sembollerle gösterilmelidir.

16. **Tartışma ve Sonuç** bölümünde, araştırmanın sonucunda elde edilen bulgular, diğer araştırmacıların bulguları ile karşılaştırılması ve literatüre olan katkısı belirtilmelidir.

17. **Kaynaklar,** kaynaklar listesi soyadına göre alfabetik ve kronolojik olarak sıralanmalıdır. Metin içerisindeki kaynak, yazar soyadı ve yayın tarihi yazılarak Toprak (2006); Toprak ve Erol (2007); Toprak ve ark. (2008); Toprak (2012, 2013) cümle sonunda ise sadece parantez içerisinde yazar soyadı ve yayın tarihi noktalama işaretinden önce yazılmalıdır (Toprak 2006; Toprak ve Toprak 2007; Toprak ve ark. 2008; Toprak 2012, 2013); Cümle sonunda birden çok kaynak belirtilecek ise kaynaklar tarih sırasına göre küçükten büyüğe doğru sıralanmalıdır. Metin içerisinde ikiden çok yazarlı kaynak kullanımlarında ilk yazarın soyadı yazılmalı diğer yazarlar ise "ve ark." kısaltması ile belirtilmelidir. Yazılarda ve yerine & işareti kullanılmamalıdır.

18. Dergi adlarının kısaltılmasında "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" son baskısı esas alınmalıdır. Kaynaklar listesinde yazar(lar)ın aynı yıla ait birden fazla yayını varsa, yayının tarihinin yanına "a" ve "b" şeklinde ibare koyularak belirtilmelidir.

19. Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır;

Sürelı Yayın:

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK. (1992). Induced transplacental transmission of *N. Caninum* in cattle. *J Am Vet Med Ass.* 201, 709-713.

Yazarlı Kitap:

Fleiss JI. (1981). *Statistical methods for rates and proportions.* Second edition. New York: John Willey and Sons, p.103.

Editörlü Kitap:

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KI, eds.. (1990). *Manual of Clinical Microbiology.* Fifth edition. Washington DC: IRL Press, p.37.

Editörlü Kitapta Bölüm:

Bahk J, Marth EH. (1990). Listeriosis and *Listeria monocytogenes.* Cliver DD. eds. *Foodborne Disease.* Academic press Inc, San Diego. p.248-256.

Kongre Bildirileri:

Çetindağ M. (1994). Pronoprymna ventricosa, a new digenetic trematoda from the Alosa fallax in Turkey. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October 10-14, Izmir-Turkey.

Tezler:

Aksoy E. (1997). Sığır Vebası hastalığının histolojik ve immuno-peroksidad yöntemle tanısı üzerine çalışmalar. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Anonim:

Resmi kuruluşlar (Tarım ve Orman Bakanlığı, OIE, FAO vb.) internet sitesi harici kaynakların kullanımı önerilmez. Anonim. (2009). Contagious equine metritis. Erişim adresi: <http://www.cfsph.ias-tate.edu/Factsheets/pdf>, Erişim tarihi: 17.10.2009.

Peter AT (2009). Abortions in dairy cows. Erişim adresi: <http://www.wcds.afns.ualberta.ca.htm>, Erişim tarihi: 14.11.2009.

20. Kaynakların sonuna mevcut ise doi numarası yazılmalıdır.

c. Tam makale: Başlık ve ana metin içeriğinin birleştirilmesiyle oluşturulan tam yazı *.pdf dosyası olarak sisteme yüklenmelidir.

21. Kaynaklar alfabetik olarak sıralandıktan sonra ayrıca numaralandırmaya gerek yoktur.

22. Simgelerin kullanımına dikkat edilmelidir. Örnek olarak çarpma işareti olarak "x" yerine "x" kullanılmalıdır.

23. Latince cins ve tür isimleri italik yazı tipi ile yazılmalıdır (*Monachus monachus*, *Anisakis* sp.). Tüm ölçüler SI'e (Systeme Internationale) göre verilmelidir.

24. Deneylerde kullanılan kimyasal, kit vb. gereçlerin marka, model, üretim yeri bilgileri yer almalıdır. Örnek: Blu-T4 ETVC aşısı (Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara, Türkiye).

25. Başlık sayfası, makalenin ana metni ve tam makale olmak üzere üç dosya başvuruda bulunmalıdır.

26. Yayınlanması uygun görülen çalışmaların basılmasına ilişkin karar yazar(lar)ına bildirilir.

27. Türkçe yazılar hazırlanırken dil ve kelime bilgisi kuralları için Türk Dil Kurumu'nun hazırladığı kaynaklar esas alınmalıdır.

28. Dergiye gönderilen yazılar kabul tarihine göre yayınlanır. Dergi gerekli gördüğü durumlarda sıralamayı değiştirme hakkını saklı tutar.

Yayın, Hakemleme, Etik İlkeleri ve Yasal Sorumluluklar

Bu dergi öncelikli olarak bakteriyoloji, parazitoloji, viroloji, halk sağlığı, epidemiyoloji, aşı üretimi, laboratuvar kalite yönetim sistemleri olmak üzere, diğer tüm veteriner bilim alanlarını kapsamaktadır. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi araştırma ve yayın etiği standartlarına bağlıdır. İntihal tespit edilmesi kabulden sonra bile bir yazının reddedilmesine neden olabilir. Editörler, herhangi bir etik suistimal şüphesinde, ilgili uluslararası yayın ve araştırma etiği kurallarına (COPE guidelines, Cse White Paper on Publication Ethics, ORI) uygun olarak hareket eder. Dergimizde yayınlanması için gönderilen bilimsel çalışmaların European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar için Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik hükümlerine uygun olarak yapıldığını, gerekli tüm kurumsal etik ve yasal izinlerin alındığını varsayarak, bu konuda dergi yönetimi olarak sorumluluk kabul etmemektedir. Çalışmada "Hayvan" ögesi kullanılmış ise yazarlar, yazının Gereç ve Yöntem bölümünde çalışmalarında hayvan haklarını koruduklarını ve ilgili etik ku-

ruktan onay aldıklarını belirtmek zorundadır. Dergimiz gönderilen bilimsel çalışmalarda European consensus-platform for alternatives stratejilerine uygun olarak deney hayvanlarının kullanımında 3R (Replacement, Reduction ve Refinement) kuralına uygun davranılmasını bekler ve destekler. Farklı etik kurul onayı ya da izin alması (Örneğin klinik araştırmalar etik kurul onayı gibi) değerlendirme süresince fark edilen yazıların değerlendirmesine ara verilerek gerekli izinleri alması için sorumlu yazar uyarılır, gerekli izinlerin tamamlanmasından sonra yayın sürecine devam edilir. Söz konusu onay bilgileri gereç ve yöntem kısmına eklenir. Çalışmalarla ilgili uluslararası ve ulusal düzenlemeler çerçevesince gerekli kurum ve kuruluşlardan alınması gereken tüm izinlerin (Örneğin yaban hayatına yönelik çalışma izin belgesi gibi) alınarak çalışmaya başlanması yazarların sorumluluğundadır. Dergi bu konuda sorumlu tutulamaz. Yazının sorumlu yazarı tarafından sistem aracılığıyla gönderilmesi ile yazının bir bölümünün veya tamamının başka bir yerde yayınlanmadığı ve aynı anda bir diğer dergide değerlendirilme sürecinde olmadığı şeklinde değerlendirilir. Tüm yazarlar yayın içeriği ve hakkında hem fikir olduklarını beyan etmiş sayılırlar. Maddi destek ve çıkar ilişkisi durumu ayrıca başvuru sırasında editöre bildirilmelidir. Yazıların Türkçe ve İngilizce tam metinlerinin gönderilmesi ve yayına kabul edilmesi halinde tek bir yazı olarak kabul edilerek sırasıyla Türkçesi ve İngilizcesi yayınlanır. Gönderilen yazıların basım düzeltmeleri orijinal metne göre yapıldığından, yazıların her türlü sorumluluğu (etik, bilimsel, yasal, vb.) yazarlara aittir. Dergide yayınlanmak üzere gönderilen yazılar tüm yazarlar tarafından imzalanan "Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi" ile dergiye gönderilir.

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji dergisi açık erişimi desteklemektedir. Yayınlanmak üzere kabul edilen yazıların her türlü yayın hakkı yayıncıya aittir. Ancak yazarlar "Eğitim amaçlı, kendi kişisel kullanım hakkı, Makalenin tümünü veya bir kısmını bir toplantıda veya konferansta kullanma, Makalenin tümünü veya bir kısmını bir toplantıda veya konferansta kullanma, Çalışmalarını çevrimiçi olarak kurumsal depolarda veya internet sitelerinde yayınlama, Makalelerinin görünürlüğünü arttırmak için herhangi bir sosyal medya platformu kullanma, Makalede açıklanan herhangi bir işlem veya prosedür için patent ve ticari marka haklarını saklı tutar. Yayınlanması uygun görülen çalışmaların basılmasına ilişkin karar yazar(lar)ına bildirilir. Türkçe yazılar hazırlanırken dil ve kelime bilgisi kuralları için Türk Dil Kurumu'nun hazırladığı kaynaklar esas alınmalıdır. Dergiye gönderilen yazılar kabul tarihine göre yayınlanır. Dergi gerekli gördüğü durumlarda sıralamayı değiştirme hakkını saklı tutar. Yazıların basım işleri ve yayınlanması için herhangi bir ücret talep edilmez. Yazarlara da yazılarının basılması karşılığında herhangi bir ödeme yapılmaz. Yayınlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez. Gönderilen makalelere ilişkin itirazda veya şikâyetle bulunmak isteyen yazarlar, ilk olarak, sorumlu yazı işleri müdürüne bir itiraz mektubu göndermelidir. Mektupta, itiraz veya şikâyet konusu hakkında ayrıntılı bilgi verilmelidir. Böyle bir durumda, sorumlu yazı işleri müdürü konuyu en kısa sürede incelemesi için editör veya yayın kurulu üyelerinden birini görevlendirir. Gerekirse, sorunu araştırmak için arabulucu olarak harici bir uzman atanabilir. Ancak sorumlu yazı işleri müdürü, tüm temyiz ve şikâyetler için karar verme sürecindeki nihai otoritedir. Dergi, itiraz ve şikâyetlerini incelerken COPE kurallarına uyar. Yayın hakkı devri sözleşmesine buradan ulaşabilirsiniz.

Tarihçe ve Arşiv

1960-1976 yılları arasında Etlik Veteriner Bakteriyoloji Enstitüsü Dergisi,

1977-1986 yılları arasında Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi,

1987 yılından günümüze kadar Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi adıyla yayınlanmıştır.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Publication Conditions

1. Manuscripts in Turkish and English languages should be written as a justified text leaving 25 mm from all margins, in 12pt Times New Roman text character, in single-spaced page format and A4 (210 × 297 mm) size. All manuscripts including figures and tables should not exceed 16 pages for scientific articles, 10 pages for reviews, 6 pages for case reports and short communications and 4 pages for letters to the editor except references.

2. The manuscripts in *.doc or *.docx formats and figures of maximum 300dpi resolution in *.jpeg or *.tiff formats and tables should be sent via DergiPark.

Three files to be submitted during the Application

a. Title Page

3. Type of manuscript (original research, up-to-date/invited review, case report, short communication, letter to the editor) is indicated.

4. Title summarizing the subject is written. It is suggested not to exceed 10 words.

5. After the first letter of names and all letters of surname of authors are written in capital letters, institutions and addresses of authors should be written via enumerating the names by superscripts. Names of cities and countries should be indicated in addresses. ORCID number submission is obligatory. ORCID numbers can be written after addresses with an indication of letters.

6. The responsible author should be indicated with "*" and after address lines, full address, e-mail, and phone number should be added. Institution information should be enumerated starting with 1 and address, name of city and country should be added under authors' names. Example:

The Structure of Papilla Filliforms in Mice Under Light and Scanned Electron Microscope

Burhan Toprak^{1,a,*}

¹Veterinary Control Central Research Institute, Laboratory of Genetics, 06020, Ankara, Turkey

^aORCID: 0000-0003-1082-4559

*burhan.toprak@tarimorman.gov.tr, Ahmet Şefik Kolyalı Cad. No: 23-1 06200, Keçiören-Phone: +903123254826

Use of laboratory animals Ethics Committee and other decisions of Ethics Committee and Permissions: Information about related decisions (Issue of institution, date, and number) should be given under this title.

Acknowledgment: This part should take place in the title page. All communications presented in congresses earlier should be indicated in title page with name, place, and date of congress.

Financial Support and Conflict of interest: All persons and institutions in support of finance and, if any, conflict of interest with authors should be disclosed at the end of the article. In case of no conflict of interest, it should be stated as "There is no person/institution funding the work and authors have no conflicts of interest."

b. The main text of Article

7. Title, abstract and up to five keywords should be uploaded in both Turkish and English. They should also be uploaded to the system with the main text and resources, but as a separate file from the title page. For non-Turkish language speakers, a Turkish language title, summary and keywords will be written by the editorial staff.

8. In original scientific research, case reports and short reports should be prepared according to the following range. Turkish

and English titles, abstracts, at least five keywords, introduction, materials and methods, findings, discussion and conclusions and references.

9. Tables and figures should be separately uploaded to the system and also placed where they should be in the text.

10. Name of the author, institution, e-mail information and so on. details don't should be in this main text file. All lines should be numbered continuously.

11. **The summary** should briefly describe the results and conclusion, less than 250 words.

12. **Five keywords** should be selected from Medical Subject Headings, should be written in alphabetical order.

13. **The introduction** should include summary literature relevant subject of the article and the purpose of the study should be emphasized in the last paragraph.

14. **Materials and methods** should be written in a comprehensible way and be aware giving details. Subtitle can be used if desired. Subtitles must be defined in italic font. (Extraction process, Statistical method, Experimental design, etc.)

15. **In the findings**, the data should be clearly indicated without repetition. Findings should be supported by tables and figures and presented briefly. Table headings should be indicated above the table and figure and graphic headings should be given below the figure. The coding of tables and figures should be indicated by numeric or alpha-numeric symbols.

16. **In the Discussion and Conclusion**, the findings obtained from the research should be compared with the findings of other researchers and their contribution to the literature should be specified.

17. **References** should be listed and numbered alphabetically and chronologically according to the surnames. References in the text should be written as author surname and date of publication, for example, Toprak (2006); Toprak and Erol (2007); Toprak et al. (2008); Toprak (2012, 2013). If the references are at the end of the sentence, references should be written only in parenthesis as the surname of the author and date of publication and the surname of the author and the date of publication should be also written before the punctuation mark. For example (Soil 2006; Soil and Soil 2007; Soil et al. 2008; Soil 2012, 2013); If more than one reference is to be given at the end of the sentence, the references should be ordered from small to large in order of date. "&" mark should not be used instead of "and".

18. Abbreviations of journals should be made based on the last edition of "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation". In the list of references, if the author has more than one publication of the same year, it should be indicated with "a" and "b" next to the publication date.

19. Reference writing and ranking should be done as follows;

For articles:

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK. (1992). Induced transplacental transmission of *N. caninum* in cattle. *J Am Vet Med Ass.* 201, 709-713.

For books:

Fleiss JL. (1981). *Statistical methods for rates and proportions*. Second edition. New York: John Wiley and Sons, p.103.

For edited books:

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KI, eds.. (1990). *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth edition. Washington DC: IRL Press, p.37.

For the chapter in edited books:

Bahk J, Marth EH. (1990). Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. Cliver DD. eds. *Foodborne Disease*. Academic Press Inc, San Diego. p.248-256

For congress papers:

Çetindağ M. (1994). Pronoprymna ventricosa, a new digenic trematoda from the *Alosa fallax* in Turkey. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October, 10-14, İzmir-Turkey.

For dissertations:

Aksoy E. (1997). Sığır Vebası hastalığının histolojik ve İmmunopero-
ksidaz yöntemle tanısı üzerine çalışmalar. Ph.D. Thesis, Ankara University Institute of Health Sciences, Ankara

Anonymous:

It is not recommended to use other internet sites other out of website of the official institutions (Ministry of Agriculture and Forestry, OIE, FAO, etc.). Anonymous. (2009). Contagious equine metritis. Access address: HTTP: // www.cfsph.iastate.edu/Fact-sheets/pdf, Date of access: 17.10.2009.

Peter AT (2009). Abortions in dairy cows. Access address: HTTP://www.wcds.afns.ualberta.ca.htm, Date of access: 14.11.2009.

20. If doi number available, Doi number should be written at the end of the references.

c. Full article: Full text created by combining title and main text content should be uploaded to the system as *.pdf file.

21. If the references are ranked alphabetically, there is no need to renumber them.

22. It should be attention to the use of symbols. For example, as multiplication sign, "x" should be used instead of "x".

23. Latin genus and species names should be written in italics (*Monachus monachus*, *Anisakis sp.*). All dimensions should be given according to SI (Système Internationale).

24. The brand, model and production place information of the chemical and kit used in the experiments should be written. Example: Blu-T4 ETVAC vaccine (Central Veterinary Control and Research Institute, Ankara, Turkey).

25. It should be applied with three files consisting of the title page, the main text of the article, and the full article.

26. The decision to publish works that are deemed appropriate to publish shall be notified to the author(s).

27. When writing articles in Turkish, the vocabulary rules should be based on the sources prepared by the Turkish Language Association.

28. Articles sent to the journal are published according to the date of acceptance. The journal may change the publishing rank when it deems necessary.

Publication, Arbitration, Ethical Principles, and Legal Responsibilities

This journal covers primarily bacteriology, parasitology, virology, public health, epidemiology, vaccine production, laboratory quality management systems, and all other veterinary sciences.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology is subject to research and publication ethics standards. Plagiarism can lead to rejection of an article even after acceptance. The editors act in accordance with the relevant international publication and research ethics rules (COPE guidelines, CSI White Paper on Publication Ethics, ORI) in case of any ethical misuse. Assuming that the scientific studies submitted for publication in our journal are carried out in accordance with the provisions of the Regulation on Welfare and Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes with European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, and that all necessary institutional ethics and legal permissions are taken, the journal management does not accept responsibility as a matter of responsibility. If the "Animal" element is used in the study, the authors must state that they protect animal rights in their studies and that they have taken approval from the relevant ethics committee. Our journal expects and supports the compliance of 3R (Replacement, Reduction, and Refinement) rules in the use of experimental animals in accordance with the European consensus-platform for alternatives strategies in scientific studies.

Approval of different ethics committee or permission (for example, clinical research ethics committee approval) during the evaluation of the discontinuation of the review of the articles that are required to receive the necessary authorizations are warned, the publication process is continued after the necessary permissions are completed. The approval information should be added to the material and method section.

It is the authors' responsibility to ensure that all permits (such as work permits for wildlife) are obtained from the relevant institutions and organizations in accordance with international and national regulations. The journal cannot be held responsible for this matter.

History and Archive

Journal was published between 1960-1976 as Journal of Etlik Veterinary Bacteriology Institute,

Between 1977-1986 as Journal of Etlik Veterinary Microbiology Institute Dergisi,

From starting 1987 till today as Journal of Etlik Veterinary Microbiology.

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi*

Aşağıda başlığı bulunan ve yazarları belirtilen yazının;

Başlığı:

1. Yazar(lar) olarak, yazım(ız)ın orijinal olduğunu, değerlendirilmek üzere eşzamanlı olarak başka bir dergiye sunulmadığını, halen başka bir dergide değerlendirme aşamasında olmadığını, bildiri özeti olmak dışında daha önce başka bir dergide yayınlanmadığını, bilimsel ve etik sorumluluğunun tarafım(ız)a ait olduğunu, diğer yazarlara ulaşılamaması halinde, tüm yazarların bu başvurudan haberdar olduklarını ve tüm yazarların araştırmanın her sürecine aktif katıldıklarını beyan ederim(z).
2. Yapılan çalışmanın derginin yayın kurallarında belirtilen tüm etik değerleri ve kuralları gözeterek, toplumu, herhangi bir kurumu ya da kişiyi rencide edici herhangi bir şekilde yapılmadığını, deney hayvanlarının kullanımında etik kurallarına uyulması için gerekli özenin gösterildiğini, dergi sahibi, sorumlu yazı işleri müdürü, editörü ve yayın kurulunun yapılan çalışmadan ve yazıdan dolayı doğabilecek tüm hukuki işlemlerde sorumluluk taşımadığını kabul ederim(z).
3. Yazım(ız)ın yayınlanmak üzere kabul edilmesi halinde, gerekli görülen düzeltmelerle birlikte, derginizin belirttiği tüm yazım basılı ve elektronik olarak yayın kurallarına uygun basılması, çoğaltılması, dağıtılması gibi tüm haklarını yayın kurallarında belirtilen diğer haklarım(ız) saklı kalmak koşuluyla Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'ne devrettiğimizi gayri kabili rücu olarak kabul ederim(z).

Yazar Adı ve Soyadı**	Sorumlu Yazar	İmza	Tarih/Yer

*Yazının yayınlanmak üzere Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'ne kabul edilmemesi durumunda bu sözleşme geçersizdir. Sözleşmenin bağımsız kopyaları farklı kuruluşlarda çalışan yazarlar tarafından ıslak olarak imzalanarak ayrı ayrı sisteme yüklenebilir. İmzalar özgün olmalıdır.

**Yazarlar yazıda belirtildiği gibi sıralanmalıdır.

Sorumlu Yazara ait telefon ve yazışma adresi:

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Copyright Release Form*

Author(s) of the manuscript of which title and authors are undermentioned declare(s) that

Title:

1. The manuscript is original and has not been submitted or considered for publication elsewhere, is not published elsewhere except in the form of abstract, and scientific and ethical responsibility belong(s) to me/us. In case all authors are not reached, all authors have been informed of the application and all authors have participated in the work process actively.

2. The work has been performed in consideration of ethical values and rules of the journal indicated in the publication rules; has been performed in a way not to offend any society, foundation or person and special care are shown to comply with ethical rules during animal testing. The owner of the journal, editor in chief, the editorial board are not responsible for the legal acts generated from the work and the manuscript.

3. In case of acceptance for publication of the manuscript, with the corrections considered necessary I/we hereby grant the Journal of Etlik Veterinary Microbiology, without recourse, the right to publish, distribute, reproduce the manuscript according to your Journal's all printing and electronic printing rules reserving the other rights indicated in the publication rules.

Full Name of the Author**	Corresponding Author	Signature	Date/Place

*The contract is invalid in case the submitted manuscript is not accepted. Independent copies of the contract can be ink signed by the authors working in different institutions and be uploaded separately.

**Authors' name must be in order as they are in the manuscript.

Contact Number and Address of the Corresponding Author:



Invitro decontamination effect of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on important foodborne pathogens

Tahsin Onur Kevenk¹, Ahmet Koluman²

¹ Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, TR 68000 Aksaray, Turkey.
² Pamukkale University, Faculty of Technology, Department of Biomedical Engineering, TR 20160 Denizli, Turkey.

Geliş Tarihi / Received: 15.01.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 23.03.2021

Abstract: Zinc oxide (ZnO) has been used for many years in the pharmaceutical, cosmetic, paint, textile, and food industries for coating surfaces, absorbing UV rays and due to its antimicrobial properties in nanoscale, it has been identified as an important chemical for decontamination. Zinc can be found in many foods as well and its allowed daily intake for adults has been reported as 8-11 mg. Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO-NPs) are generally regarded as safe (GRAS) for it being stable under hard processing conditions. Compared to organic acids, ZnO-NPs have better durability, selectivity, and heat resistance. In the present study, it was aimed to understand the decontamination effect of ZnO-NPs on *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, and *E. coli* O157 to develop novel, safe decontamination agents for the food industry. For this purpose, <50 µ ZnO-NPs were added into Tryptic Soy Broth in 20 mMolar final concentration for the understanding of the antimicrobial effect. After inoculation of the pathogens, a counting procedure was performed using the Tryptic Soy Agar by the pour on plate method at 0, 1st, 2nd, 4th, 6th, 8th, 12th, and 24th hours. As a result, *S. enteritidis* and *S. aureus* 3 Log CFU/mL, *S. typhimurium* and *E. coli* O157 4 Log CFU/mL, *L. monocytogenes* 2 Log CFU/mL decreased in 24 hours.

Keywords: Decontamination, foodborne pathogens, nanoparticles, zinc oxide

Çinko oksit nanopartiküllerin (ZnO-NP) önemli gıda kaynaklı patojenler üzerine in vitro dekontaminasyon etkisi

Özet: Çinko oksit (ZnO) ilaç, kozmetik, boya, tekstil ve gıda endüstrilerinde yüzeyleri kaplamak, UV ışınlarını absorbe etmek için uzun yıllardır kullanılmaktadır ve nano ölçekte antimikrobiyal özellikleri nedeniyle dekontaminasyon için önemli bir kimyasal olarak tanımlanmıştır. Çinko, birçok besinde de bulunabilen bir kimyasal olup yetişkinler için izin verilen günlük alım miktarı 8-11 mg olarak bildirilmiştir. Çinko Oksit Nanopartiküller (ZnO-NP'ler) zorlu gıda işleme koşulları altında stabil kalabilmeleri nedeniyle genellikle güvenli olarak (GRAS) kabul edilmişlerdir. Organik asitlerle karşılaştırıldığında, ZnO-NP'ler daha iyi dayanıklılığa, seçiciliğe ve ısı direncine sahiptir. Bu çalışmada, gıda endüstrisi için yeni, güvenli dekontaminasyon ajanları geliştirmek için ZnO-NP'lerin *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157 üzerindeki dekontaminasyon etkisini anlamak hedeflenmiştir. Bu amaçla, antimikrobiyal etkinin anlaşılması için Tryptic Soy Broth içerisine nihai konsantrasyonu 20 mMolar olacak şekilde <50 µ büyüklüğünde ZnO-NP'ler eklenmiştir. Patojenlerin inokülasyonundan sonra, 0., 1., 2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde Tryptic Soy Agar'da dökme plak yöntemi ile bakteri sayımları yapılmıştır. Sonuç olarak, 24 saatte *S. enteritidis* ve *S. aureus* 3 Log CFU/mL, *S. typhimurium* ve *E. coli* O157 4 Log CFU/mL, *L. monocytogenes* 2 Log CFU/mL azalmıştır.

Anahtar kelimeler: Çinko oksit, dekontaminasyon, gıda kaynaklı patojenler, nanopartikül

Introduction

Particles which dimensions between 1-100 nanometers (nm) are called nanoparticles. It has been reported that, because of their unique physico-chemical features, high surface area, and volume ratio, the nanoparticles have great antibacterial activity in fluid and solid environments (Bharat et al., 2019; El-Mashad, Pan, 2015). Therefore, depending on the improvement of hygiene understanding in the last few decades these nanoparticles have been used in several areas such as biomedical, education,

textile, and food industry (Deshmukh, Patil, Mullani, Delekar, 2019).

There are plenty of different types of nanoparticles according to their basic substance it contains. Some inorganic metals (Al, Cu, Au, Fe, Ag, Ti, Zn) and metal oxides (Al₂O₃, CuO, Cu₂O, TiO₂, ZnO) are examples of these (Rajput et al., 2018). In the year 2010, it was considered that between 260,000-309,000 tons of nanoparticles were produced in the world and it was estimated that this amount of number is going to increase 585,000

tons by the year 2019 (Yadav T., 2014). Accordingly, zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) are known as the third most-produced metal-oxide nanoparticles with 33,400 tons per year (Peng, Tsai, Hsiung, Lin, & Shih, 2017). It has been reported that ZnO-NPs are a bio-safe material. On the other hand, according to some researchers, the information about the toxicity of ZnO-NPs are still limited (Rajput et al., 2018). However, the relationship between the size and shape of particle and toxicity has been demonstrated (Khare et al., 2015).

The bacterial cell wall is defined as a cellular structure consisting of a peptidoglycan layer that increases durability and osmotic resistance. According to its structural features and content, the bacterial cell wall is divided into two subgroups, gram-positive and gram-negative (Hajipour et al., 2012). Several studies showed that gram-negative bacteria such as *E. coli* has been found more sensitive to nanoparticles than gram-positive ones like *S. aureus* and *L. monocytogenes* (Baek YW, An YJ 2011). Although the lethal effects of nanoparticles on bacteria are not fully understood, it is thought that the damage occurs as a result of electrostatic interaction between nanoparticles and the bacterial cell wall (Soenen et al., 2011).

Salmonella enteritidis, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, and *E. coli* O157 have been reported as the major foodborne pathogens that cause food poisoning or intoxications in the USA (Prevention, 2019).

Salmonella enteritidis and *Salmonella typhimurium* are members of the *Salmonella* genus which are gram-negative bacilli, facultative anaerobe, non-spore forming, motile, catalase positive, and oxidase negative. It is known that the *Salmonella* genus involves more than 2500 serotypes, but *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* are the most isolated serotypes in human infections (Dar et al., 2017; Hur, Jawale, Lee, 2012).

S. aureus is gram-positive, non-motile, non-spore forming, catalase, coagulase, thermo nuclease positive, coccus shaped bacteria that can be found in the healthy humans' nasal flora (Wu et al., 2016). *S. aureus* can produce more than twenty enterotoxins which are the reason of staphylococcal intoxication (Balaban, Rasooly, 2000; Hennekinne, De Buyser, Dragacci, 2012).

L. monocytogenes is gram-positive, motile, non-spore forming, ubiquitous, psychrotrophic, and in

intracellular microorganism which is the reason of an important food-borne disease called listeriosis (Kevenk, Terzi Gulel, 2016). It has been reported that listeriosis can occur because of consuming various source of foods such as dairy products, meat products or unwashed fruits. Furthermore, it has been reported that listeriosis is a long incubation period disease and may cause many symptoms such as abortions, premature births, meningitis, septicemia. Also, listeriosis has a relatively high (20-30%) mortality rate (Gandhi, Chikindas, 2007).

In this research, it is aimed to understand the in vitro decontamination effect of ZnO-NPs on important foodborne pathogens and to guide the development of new types of disinfectants containing nanoparticles for future use.

Materials and Methods

Bacterial Strains

In the present study, three gram-negative and two gram-positive foodborne pathogen such as *Salmonella enteritidis* ATCC 31194, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* O157 ATCC 43895, *S. aureus* ATCC 46300, and *L. monocytogenes* ATCC 7644 used for understanding the decontamination effect of ZnO-NPs.

Preparation of ZnO-NP Solution

Nanopowder ZnO which has <50 μ particle size and 10.8 m²/g surface area (Sigma-Aldrich 677450) diluted in tryptone soy broth (TSB, Oxoid CM0129). Nanopowder TSB solution was prepared under aseptic conditions. The stock solution was prepared in 0.05 L volume and the final concentration of ZnO-NPs were calculated 1 Molar.

Method

All our strains were stored at -20 °C before revived in TSB. Each strain was studied under optimal conditions recommended by International Organization for Standardization (ISO). For this purpose, incubation and growth parameters which were specified in ISO 6579 for *Salmonella* species, ISO 6888 for *S. aureus*, ISO 11290 for *L. monocytogenes*, and ISO 16654 for *E. coli* O157:H7 were used. The strain's growth conditions were given in Table 1.

Stock ZnO-NPs solution, which was 1 Molar concentration, diluted to 20 mmol/L in sterile TSB for investigation of the decontamination effect on target microorganisms. Later 9 ml. 20 mmol/L ZnO-

NPs solution dispensed into sterile test tubes under aseptic conditions for microbiological analysis.

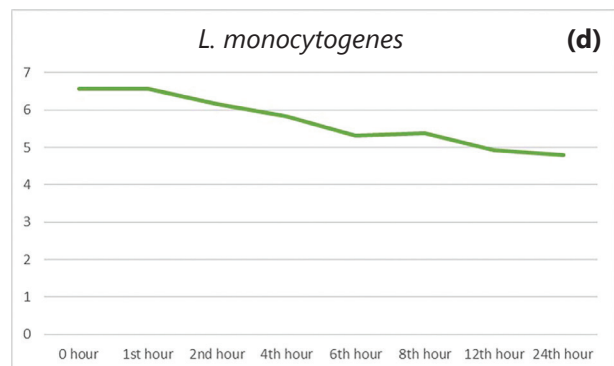
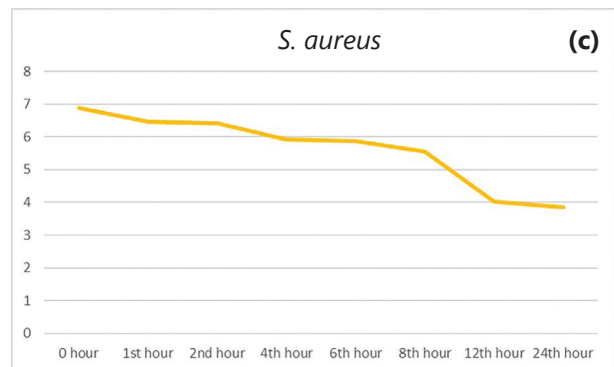
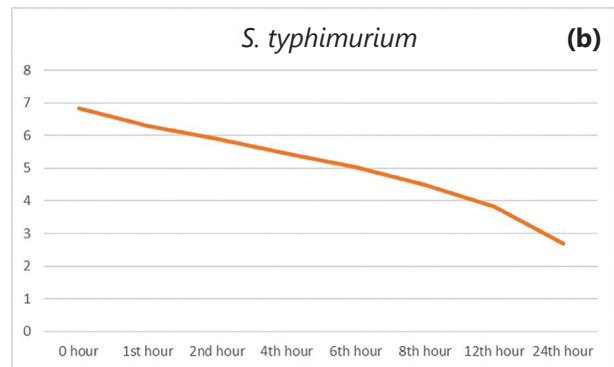
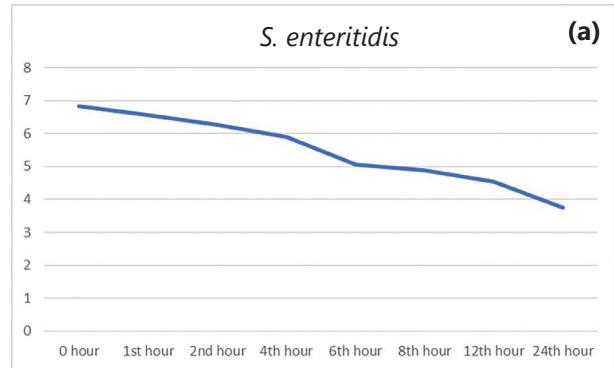
For investigation of the decontamination effect, 100 µl 24 hours old fresh cultures of the pathogens were added into sterile test tubes which were containing TSB with 20 mMolar ZnO-NPs. After inoculation of the pathogens, a counting procedure was performed using the Plate Count Agar (PCA, Oxoid CM0463) at 0, 1st, 2nd, 4th, 6th, 8th, 12th, and 24th hours. For this purpose, 9 ml serial decimal dilutions which were containing 0.1% peptone water (Oxoid CM1049), were prepared and autoclaved at 121°C for 15 minutes. Enumeration of microorganisms was executed according to ISO 4833-1 method by pour plate technic (ISO, 2014).

Table 1. Growth condition of test strains.

Bacteria	ID no.	Media	Opt. Temp. (°C)
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 31194	TSB-PCA	37
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	TSB-PCA	37
<i>S. aureus</i>	ATCC 46300	TSB-PCA	37
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 7644	TSB-PCA	37
<i>E. coli</i> O157	ATCC 43895	TSB-PCA	37

Results

In the present study, the invitro decontamination effect of 20 mmol/L concentration, <50 µ particle size zinc oxide Nanoparticles (ZnO-NPs) on important foodborne pathogens was investigated. For this purpose, five important food-borne pathogens, 3 gram-negative and 2 gram-positive were used in our study. At 0-hour, bacterial count of *Salmonella enteritidis* ATCC 31194, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 46300, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* O157 ATCC 43895 was 6.83, 6.80, 6.89, 6.56, and 6.81 Log CFU/mL, respectively. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *E. coli* O157 ATCC 43895 were found the most sensitive in all strains. On the other hand, *L. monocytogenes* ATCC 7644 was the most resistant in all tested strains. The reduction effect of 20 mmol, <50 µ ZnO-NPs were calculated 3.09, 4.14, 3.09, 1.77, and 4.08 Log CFU/mL, respectively. Analyses repeated six times and the average results shown in the figures below.



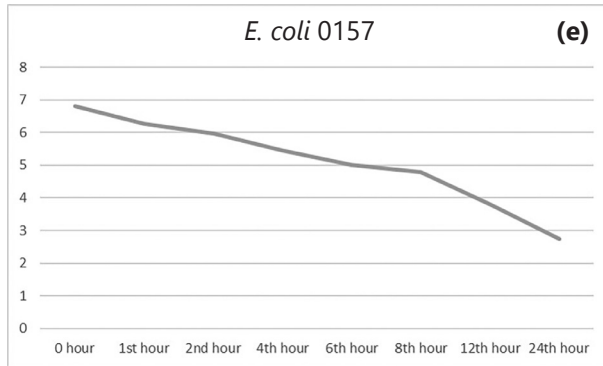


Figure 1. Decontamination effect of 20 mmol/L zinc oxide Nanoparticles (ZnO-NPs). Reduction of *Salmonella enteritidis* (a), *Salmonella typhimurium* (b), *S. aureus* (c), *L. monocytogenes* (d), *E. coli* O157 (e).

Discussion and Conclusion

In our study, the invitro decontamination effect of ZnO-NPs in 24 h was found on average 3 Log CFU/mL in all test groups. In comparison, it has been reported that gram-positive bacteria are more sensitive to ZnO-NPs than gram-negative bacteria (Tayel et al., 2011). However, in our study maximum reduction has been seen on both gram-negative and positive bacteria such as *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, and *E. coli* O157. This situation may be attributed to the fact that bacteria used in this study, were certificated strains rather than wild strains. In the present study, a considerable reduction effect was observed in all test groups with an average of 3 Log CFU/mL. Our results showed similarities with Das et al. (2017) who investigated the disinfection effect of ZnO-NPs on multi-drug resistant (MDR) strains. According to their results, a 99% disinfection effect was achieved on MDR strains. Mirhosseini and Arjmand (2014) studied the decontamination effect of ZnO-NPs against the *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, and *B. cereus*. Correlatively to our results in 24 h *L. monocytogenes*, *E. coli*, and *S. aureus* were reduced approximately 3 or 4 Log CFU/mL. In another paper, Liu et al. (2009) were investigated the antibacterial activities of ZnO-NPs against *E. coli* O157:H7. Their results showed that ZnO-NPs dramatically inhibited *E. coli* O157:H7 strains in 24 h. The reason of this may be connected to the inhibitory effect of ZnO-NPs increased as concentration increases, and the size of the particle decreases. In another study on *Salmonella* which is an important foodborne agent, Fonseca et al. (2019) were investigated to control biofilm formation and

Salmonella infiltration into turkey eggs by using ZnO nanocrystals. According to their results, searching for controlling microorganisms in the food hygiene area, ZnO nanocrystals were recognized as efficient, safe, reliable, and high potential alternatives by scientists. Similarly, in our study, it was determined that ZnO-NPs were highly effective on foodborne pathogens as well. In a different research, the antimicrobial effects of CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃ nanoparticles were analyzed on several microorganisms such as *E. coli*, *B. subtilis*, and *S. aureus* (Baek & An, 2011). As a result, CuO nanoparticles were found to be the most effective comparing to other nanoparticles tested and followed by ZnO-NPs. It was determined that the reducing ratio of ZnO-NPs on target microorganisms was in parallel to our results. Habeeb Rahman et al. (2018) were investigated ZnO-NPs and sunlight combinations as a novel technique for *Salmonella typhimurium* disinfection in water samples. Similar to our results, it was understood that ZnO-NPs were reduced *Salmonella typhimurium* by approximately 4 Log CFU/mL. Hakeem et al. (2020) were studied ZnO-NP coated active packaging for suppressing foodborne pathogens. For this purpose, researchers have been examined the antimicrobial effects of ZnO-NPs on both gram-positive and negative bacteria such as *C. jejuni* and *Lactobacillus* on chicken meat matrix in their project. Like to our outcomes, after 3 days of storages at 4°C, the antibacterial effect of ZnO-NP coated active packaging was found more or less 3-4 Log CFU/mL. In another study examining the antimicrobial effects of ZnO-NPs on gram-positive and negative bacteria Tayel et al. (2011) were used *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* as target microorganism. Unlike our study, researchers were found *Staphylococcus aureus* the most sensitive. However, in our study *Salmonella typhimurium* and *E. coli* O157 were the most susceptible strains. These results might be connected to the concentration of ZnO-NPs in the study. It has been known that high concentration causes a high antimicrobial effect as well.

Consequently, according to the results obtained from this project ZnO-NPs have an intense decontamination effect on both gram-positive and negative foodborne pathogens. Because of nanoparticles have been identified as "Generally Regarded as Safe" (GRAS), they may be recommended to use in packaging materials, disinfectants, and solutions to extend shelf life and preserve foods for a longer time in the food industry.

Ethical Statement: This study does not present any ethical concerns.

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

Acknowledgement: This research was studied within the scope of Pamukkale University Postdoctoral Research Program (DOSAP).

References

- Baek YW, An YJ (2011) Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of The Total Environment*, 409(8), 1603-1608. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.014>
- Balaban N, Rasooly A. (2000) Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61(1), 1-10. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00377-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00377-9)
- Bharat TC, Shubham Mondal S, Gupta H, Singh PK, Das AK. (2019) Synthesis of doped zinc oxide nanoparticles: A review. *Materials Today: Proceedings*, 11, 767-775. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.03.041>
- Dar MA, Ahmad SM, Bhat SA, Ahmed R, Urwat U, Mumtaz PT, Ganai NA. (2017) *Salmonella typhimurium* in poultry: a review. *World's Poultry Science Journal*, 73(2), 345-354. DOI: 10.1017/S0043933917000204
- Das S, Sinha S, Das B, Jayabalan R, Suar M, Mishra A, Tripathy SK. (2017) Disinfection of multidrug resistant *Escherichia coli* by solar-photocatalysis using Fe-doped ZnO nanoparticles. *Scientific Reports*, 7(1), 104. DOI: 10.1038/s41598-017-00173-0
- Deshmukh SP, Patil SM, Mullani SB, Delekar SD. (2019) Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 954-965. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.102>
- El-Mashad HM, Pan Z. (2015) Food decontamination using nanomaterials. *MOJ Food Processing & Technology*, 1(2). DOI: 10.15406/mojfpt.2015.01.00011
- Fonseca BB, Silva PL, Silva ACA, Dantas NO, de Paula AT, Olivieri OCL, Goulart LR. (2019) Nanocomposite of Ag-Doped ZnO and AgO nanocrystals as a preventive measure to control biofilm formation in eggshell and *Salmonella* spp. Entry Into Eggs. *Frontiers in Microbiology*, 10(217). DOI: 10.3389/fmicb.2019.00217
- Gandhi M, Chikindas ML. (2007) *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 1-15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008>
- Habeeb Rahman AP, Misra AJ, Das S, Das B, Jayabalan R, Suar M, Tripathy SK. (2018) Mechanistic insight into the disinfection of *Salmonella* sp. by sun-light assisted sonophotocatalysis using doped ZnO nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 336, 476-488. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.12.053>
- Hajipour MJ, Fromm KM., Akbar Ashkarran A, Jimenez A, D., Larramendi IR, Rojo T, Mahmoudi M. (2012) Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 499-511. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>
- Hakeem MJ, Feng J, Nilghaz A, Ma L, Seah HC, Konkel ME, Lu X. (2020) Active packaging of immobilized Zinc Oxide nanoparticles controls *Campylobacter jejuni* in raw chicken meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(22), e01195-01120. DOI: 10.1128/AEM.01195-20
- Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. (2012) *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 815-836. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x
- Hur J, Jawale C, Lee JH. (2012) Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International*, 45(2), 819-830. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.014>
- ISO TE. (2014) 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. In (Vol. 4833-1).
- Kevenk TO, Terzi Gulel G. (2016) Prevalence, antimicrobial resistance and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from raw milk and dairy products. *Journal of Food Safety*, 36(1), 11-18. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfs.12208>
- Khare P, Sonane M, Nagar Y, Moin N, Ali S, Gupta KC, Satish A. (2015) Size dependent toxicity of zinc oxide nano-particles in soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nanotoxicology*, 9(4), 423-432. DOI: 10.3109/17435390.2014.940403
- Liu Y, He L, Mustapha A, Li H, Hu ZQ, Lin M. (2009) Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), 1193-1201. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04303.x>
- Mirhosseini M, Arjmand V. (2014) Reducing pathogens by using Zinc Oxide nanoparticles and acetic acid in sheep meat. *Journal of Food Protection*, 77(9), 1599-1604. DOI: 10.4315/0362-028x.Jfp-13-210
- Peng YH, Tsai YC, Hsiung CE, Lin YH, Shih Y. (2017) Influence of water chemistry on the environmental behaviors of commercial ZnO nanoparticles in various water and wastewater samples. *Journal of Hazardous Materials*, 322, 348-356. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.003>
- Prev CDC. (2019) *Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2017: Annual Report*.
- Rajput VD, Minkina TM, Behal A, Sushkova SN, Mandzhieva S, Singh R, Movsesyan HS. (2018) Effects of zinc-oxide nanoparticles on soil, plants, animals and soil organisms: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 9, 76-84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2017.12.006>
- Soenen SJ, Rivera-Gil P, Montenegro JM, Parak WJ, De Smedt SC, Braeckmans K. (2011) Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today*, 6(5), 446-465. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.08.001>
- Tayel AA, El-Tras WF, Moussa S, El-Baz AF, Mahrous H, Salem MF, Brimer L. (2011) Antibacterial action of Zinc Oxide nanoparticles against foodborne pathogens. *Journal of Food Safety*, 31(2), 211-218. DOI: 10.1111/j.1745-4565.2010.00287.x
- Wu S, Duan N, Gu H, Hao L, Ye H, Gong W, Wang Z. (2016) A review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 8(7), 176. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2072-6651/8/7/176>
- Yadav T, Mungray AK. (2014) Fabricated Nanoparticles: Current Status and Potential Phytotoxic Threats. Woogt PD. eds. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, Cham. Vol. 230, p.83-110.



Isolation and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus canis* from dogs

Ezgi Sababoglu^{1*}, Dilek Ozturk², Hulya Turutoglu³

^{1,2,3}Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Burdur, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 22.06.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 08.04.2021

Abstract: *Streptococcus canis* is an important opportunistic pathogen that infects animals and humans. It causes various infections in dogs and cats such as arthritis, skin infections, otitis externa, septicemia, facial necrosis, and streptococcal toxic shock syndrome. It can also lead to human infections. There are still very few specific studies on the identification and antimicrobial resistance of this pathogen. In this study, the phenotypic and biochemical properties of 12 *S. canis* isolates obtained from the vaginal discharge of 11 dogs and the open wound of one dog with facial necrosis, and their susceptibility to some antibiotics was investigated. The phenotypic and biochemical properties of 12 isolates, such as esculin hydrolysis, hippurate hydrolysis, synergistic CAMP-like hemolytic activity, growth on Brain Heart-Infusion Agar (BHIA) containing 6.5% NaCl, and carbohydrate fermentation were investigated by conventional bacteriological methods. It was determined that all isolates were in the G group according to Lancefield serogrouping. The presence of the species-specific 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region (ISR) and *sodA_{int}* gene was also detected in all the isolates using the polymerase chain reaction method. All the isolates were detected to be susceptible to penicillin G, cefoperazone, ampicillin, and amoxicillin-clavulanic acid, and resistant to gentamicin and neomycin.

Keywords: Antimicrobial susceptibility, intergenic spacer region (ISR), Lancefield group G, *sodA_{int}* gene, *Streptococcus canis*.

Köpeklerden *Streptococcus canis*'in izolasyonu ve antimikrobiyal duyarlılığı

Özet: *Streptococcus canis*, hayvanları ve insanları enfekte eden önemli bir oportunistik patojendir. Köpeklerde ve kedilerde artrit, deri enfeksiyonları, otitis eksterna, septisemi, fasiyal nekroz ve streptokokkal toksik şok sendromu gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Ayrıca insan enfeksiyonlarına da yol açabilmektedir. Bu patojenin identifikasyonu ve antimikrobiyal direncine yönelik çalışmalar hala az sayıdadır. Bu çalışmada, hasta 11 köpeğin vajinal akıntısından ve bir fasiyal nekrozlu köpeğin açık yarısından izole edilen 12 *S. canis* izolatının fenotipik ve biyokimyasal özellikleri ile bazı antibiyotiklere duyarlılıkları incelendi. Oniki izolatın eskülin hidrolizi, hippurat hidrolizi, sinerjistik CAMP benzeri hemolitik aktivitesi, %6,5 NaCl içeren Brain Heart Infusion Agar (BHIA)'da üremesi ve karbonhidrat fermentasyonu gibi fenotipik ve biyokimyasal özellikleri konvansiyonel bakteriyolojik metodlar ile incelendi. Tüm izolatların Lancefield serogruplandırmasına göre G grubunda yer aldığı belirlendi. Polimeraz zincir reaksiyonu methodu ile tüm izolatlarda türe özgü 16S-23S rRNA geni intergenik ara bölge (ISR) ve *sodA_{int}* geninin varlığı da tespit edildi. İzolatların tamamının penisilin G, sefaperazon, ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit'e duyarlı, gentamisin ve neomisine dirençli olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal duyarlılık, intergenik ara bölge (ISR), Lancefield grup G, *sodA_{int}* geni, *Streptococcus canis*.

Introduction

Streptococcus canis is a well-known pathogen of dogs and has been shown to cause mainly skin, respiratory, genital, and urinary tract infections (Lamm et al. 2010). *S. canis*, which has been reported to cause many serious diseases, such as otitis externa, polyarthritis, endocarditis, abortion, neonatal septicemia, streptococcal toxic shock syndrome, and facial necrosis in cats and dogs (DeWinter and Prescott 1999; Lysková et al. 2007;

Pesavento et al. 2007; Avki et al. 2008; Lamm et al. 2010; Sharma et al. 2012; Abma et al. 2013; Mališová et al. 2019; Glassman et al. 2020), has also been reported in mastitis cases in cows (Chaffer et al. 2005; Hassan et al. 2005; Tikofsky and Zadoks 2005). *S. canis* infections are also seen in humans, with zoonotic infections having been documented by some authors (Bert and Lambert-Zechovsky 1997; Whatmore et al. 2001; Galpérine et al. 2007; Ohtaki et al. 2013; Pinho et al. 2013; Lacave et al. 2016).

Yazışma adresi / Correspondence: Ezgi Sababoglu, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Burdur-Turkey E-mail: ezgisababoglu@mehmetakif.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0003-3566-5443 • ²0000-0002-9643-8570 • ³0000-0003-0011-8597

S. canis is a beta-hemolytic streptococcus included in Group G in Lancefield serogrouping (Devriese et al. 1986; DeWinter and Prescott 1999; Sharma et al. 2012). Group G hemolytic streptococcus species causing bacteremia is less known, and thus commercial kits are inadequate in determining the types of these streptococci, which are among the factors affecting the outcome of patients (Woo et al. 2001). Although API (bioMerieux Vitek), Vitek (bioMerieux Vitek, Hazelwood, MO), and ATB Expression (bioMerieux Vitek) systems are widely used for the identification of β -hemolytic streptococci, Group G β -hemolytic streptococci cannot be detected by these systems (Woo et al. 2001). It has been reported that the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) method identifies β -hemolytic streptococcus species faster and more accurately than the VITEK2 GP ID system (Besli et al. 2018) but distinguishing between *S. canis*, *S. dysgalactiae*, and *S. pyogenes* can be difficult with the current version of Bruker's MALDI-TOF database (Schabauer et al. 2014; Nybakken et al. 2021). It has been suggested that the 16S rRNA gene is highly conserved within or between the species of the same genus and therefore can be used as the 'gold standard' for identification at the species level of bacteria (Woo et al. 2001). Hassan et al. (2003, 2005) reported that the detection of species-specific 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region (ISR) and the *sodA_{int}* gene was a fast and reliable method for the identification of *S. canis*. The authors also noted that there might be differences in the antibiotic susceptibilities of *S. canis* isolates obtained from various clinical cases of animals (Hassan et al. 2005; Lysková et al. 2007; Diren Sığirci et al. 2012).

This study aimed to determine the biochemical properties of *S. canis* isolated from the vaginal discharge and open wound samples of dogs, to verify *S. canis* isolates by polymerase chain reaction (PCR) in terms of species-specific genes, and to determine their susceptibility to some antimicrobial agents.

Materials and Methods

Bacteriological culture: In this study, 12 β -hemolytic streptococcal isolates obtained from a total of 12 dogs with vaginal discharge and facial necrosis were used. These isolates were obtained from swab samples taken from the vaginal mucosa (n = 11) of dogs with vaginal discharge and the open wound of one dog with facial necrosis and transferred to Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of

Veterinary Medicine, Department of Microbiology Laboratory for analyses. The swab samples were cultured on blood agar (Oxoid, UK) containing 1% esculin (Merck, Germany) and 5% defibrinated sheep blood. The plates were incubated in aerobic atmosphere at 37°C for 24 hours.

Phenotypical and biochemical properties:

Gram staining was performed in the growing colonies, and the streptococci-suspected colonies were purified. The biochemical properties of each isolate were detected based on catalase, hippurate hydrolysis, esculin hydrolysis, and growing features in Brain Heart Infusion Agar (BHIA) containing 6.5% NaCl, and the isolates were identified at the genus level (Hassan et al. 2005; Lysková et al. 2007; Whiley and Hardie 2009). Phenol red broth (Merck) containing 1% salicin, mannitol, lactose, sucrose, trehalose, raffinose, and sorbitol were used for carbohydrate fermentation tests. All streptococci-suspected colonies were β -hemolytic, and the synergistic CAMP-like hemolytic activity was tested using β -hemolytic *Staphylococcus aureus* (Hassan et al. 2005; Lysková et al. 2007; Whiley and Hardie 2009). For the Lancefield serogrouping of the 12 *Streptococcus* sp. isolates, a commercial latex agglutination test kit (Strep Test Kit, Plasmatec, UK) was used according to the manufacturer's instructions.

Polymerase chain reaction (PCR): The isolates suspected as *S. canis* according to the biochemical tests and Lancefield serogrouping were verified using species-specific genes (ISR and *sodA_{int}*) by PCR. For this purpose, genomic DNA isolation from the isolates was performed according to the protocol of a commercial DNA extraction kit (Genejet, Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). The pure DNAs obtained were kept at -20 °C until use. Table 1 presents the primers, target gene, and PCR product size used in the study.

The following protocols were used to detect the ISR and *sodA_{int}* genes for *S. canis* identification:

ISR: The assay was performed in a final volume of a 30 μ l reaction mixture consisting of 5 μ l template DNA, 13 μ l PCR master mix (2X) (Thermo Scientific, Lithuania), 1 μ l primer c-1 (100 pmol), 1 μ l primer c-2 (100 pmol), and 10 μ l ddH₂O (Steril ultra-pure water). Amplification was carried out in a thermal cycler (Apollo, ATC-401, Ramsey, Minnesota, USA) under the following conditions: An initial denaturation (94 °C, 4 minutes), followed by 30 cycles comprising 10 seconds at 94 °C, 30 seconds at 64 °C, 10 seconds at 72 °C and 5 minutes at 72 °C (Hassan et al. 2003, 2005).

Table 1. Species-specific oligonucleotide primers and genome sizes used for the amplification of the ISR and *sodA_{int}* genes of *S. canis* (Hassan et al., 2003, 2005).

Target gene	Oligonucleotide primer	Sequence (5'-3')	PCR product size (bp)
ISR	c-I	TAAACCGAAAACGCTGTAAGTATTA	215
	c-II	ACCATTAGTTAGTGGGTTCCCCC	
<i>sodA_{int}</i>	canis-sod-I	AGAATTATTGGCAGATGTCTACTA	263
	canis-sod-II	TTCAAGTTGCCTTCTTATTG	

sodA_{int}: The assay was performed in a final volume of a 30 µl reaction mixture consisting of 5 µl template DNA, 13 µl PCR master mix (2X), 1 µl canis-sod-I (100 pmol), 1 µl primer canis-sod-II (100 pmol), and 10 µl ddH₂O (Steril ultra-pure water). Amplification was carried out in a thermal cycler under the following conditions: An initial denaturation (94 °C, 4 minutes), followed by 30 cycles comprising 25 seconds at 94 °C, 20 seconds at 60 °C, 25 seconds at 72 °C and 5 minutes at 72 °C (Hassan et al. 2005).

Using the universal 27F-1492R primers supplied by BMLabosis (Ankara), the 16S rRNA gene of an isolate suspected of *S. canis* was amplified and the bidirectional sequence analysis (ABI 3730XL, Applied Biosystems, Foster City, CA) was performed. The 16S rRNA nucleotide sequences obtained were compared with the NCBI GenBank for the identification of species. For this purpose, the Nucleotide-Nucleotide BLAST program available on the website of the National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) was used. According to the results, the isolate had 99.72% similarity to the *S. canis* strains NCTC12191 (LR134293.1) and ATCC 43496 (KP851852.1), and therefore this isolate was used as a positive control in all PCR tests. The DNA-free PCR mix was used as a negative control.

After the amplification process, the PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gel stained with EZ-Vision® In-Gel Solution (Code: N391, Amresco, USA) at 100 V for 45 min. The bands were photographed using the gel imaging system (EDAS-290, Eastman, Kodak Company, Rochester, NY, USA) under ultraviolet light.

Antimicrobial susceptibility test: The antibiotic susceptibility tests of bacteria were performed in Mueller Hinton agar (Merck) using the Kirby-Bauer disc diffusion test according to the method of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2018). Accordingly, bacterial suspension equivalent

to a 0.5 McFarland standard was prepared with 0.85% physiological saline and spread onto the Muller Hinton agar (Oxoid, UK) containing 5% sheep blood using a swab. Amoxicillin-clavulanic acid (Oxoid, 30 µg), ampicillin (Oxoid, 25 µg), enrofloxacin (Bioanalyse, 5µg), erythromycin (Bioanalyse, 15 µg), gentamicin (Oxoid, 10 µg), chloramphenicol (Oxoid, 30 µg), lincomycin (Bioanalyse, 2 µg), neomycin (Bioanalyse, 30 µg), oxytetracycline (Oxoid, 30 µg), penicillin G (Oxoid, 10 IU), rifamycin (Bioanalyse, 30 µg), cefoperazone (Bioanalyse, 75 µg) and trimethoprim-sulfamethoxazole (Oxoid, 25 µg) discs were used for the test. The plates were incubated at 37 °C for 24 h aerobically, and the diameters of the inhibition zones formed around the antibiotic discs were measured. Their susceptibility to antibiotics was evaluated as susceptible, moderately susceptible, and resistant considering the limits determined by CLSI for Gram-positive cocci (CLSI 2018) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2019) for Group A, B, C, and G streptococci.

Results

In this study, it was determined that the *S. canis* isolates were Gram-positive and catalase-negative cocci, and all formed β-hemolysis. The obtained isolates showed synergistic CAMP-like hemolytic activity with *S. aureus* in sheep blood agar, and the carbohydrate fermentation tests revealed that the isolates hydrolyzed lactose, sucrose, and salicin but not all samples hydrolyzed raffinose and sorbitol. Four isolates obtained from the vaginal swabs of the dogs showed a mannitol-positive reaction. The isolates did not grow at 37 °C in BHIA containing 6.5% NaCl and did not hydrolyze hippurate and esculin. The biochemical properties of the isolates are given in Table 2. In addition, the 12 isolates identified as *S. canis* according to their biochemical properties were found to be in Group G according to Lancefield serogrouping.

Table 2. Biochemical test results of the *S. canis* isolates.

Biochemical tests	<i>S. canis</i> isolates (n=12)	
	n	%
Catalase	0	0
Beta-hemolysis	12	100
Hydrolysis of sodium hippurate	0	0
Hydrolysis of esculin	0	0
CAMP-like reaction	12	100
Carbohydrate fermentation		
Mannitol	4	33,33
Trehalose	9	75
Lactose	12	100
Sucrose	12	100
Raffinose	0	0
Sorbitol	0	0
Salicin	12	100
Growth on 6.5% NaCl	0	0

n: number of test-positive *S. canis* isolates

All the isolates suspected as *S. canis* by conventional bacteriological methods were confirmed to be *S. canis* using the species-specific ISR and *sodA_{int}* genes by PCR (Figures 1 and 2).

The antibiotic susceptibility test revealed that all the *S. canis* isolates were susceptible to amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin, penicillin G, and cefoperazone, and resistant to gentamicin and neomycin. Only two (16.66%) of the isolates were resistant to oxytetracycline. The susceptibility of the isolates to enrofloxacin, erythromycin, chloramphenicol, lincomycin, rifamycin, and trimethoprim-sulfamethoxazole was determined as 25%, 50%, 83.33%, 58.33%, 91.66%, and 75%, respectively. The susceptibility rates of the *S. canis* isolates to antibiotics used in the study are given in Table 3.

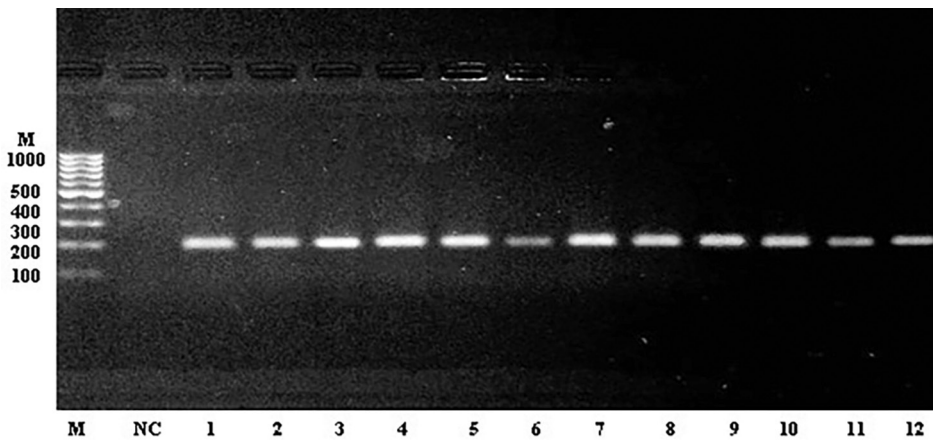


Figure 1. Lane M: 100-bp ladder DNA marker (Thermo Scientific, SM0241), Lane NC: negative control, Lane 1: positive control, Lanes 2-12: A 215-bp amplicon of the ISR gene of *S. canis* obtained by PCR with species-specific oligonucleotide primers c-I and c-II.

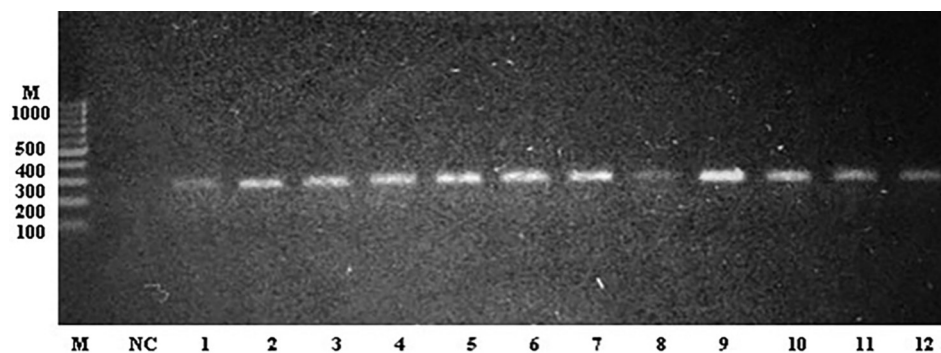


Figure 2. Lane M: 100-bp ladder DNA marker (Thermo Scientific, SM0241), Lane NC: negative control, Lane 1: positive control, Lanes 2-12: A 263-bp amplicon of the *sodA_{int}* gene of *S. canis* by PCR with species-specific oligonucleotide primers canis-sod-I and canis-sod-II.

Table 3. Antimicrobial susceptibility results of *S. canis* isolates obtained from dogs.

Antimicrobial agent	Disk content	<i>S. canis</i> (n=12)		
		Susceptible % (n)	Intermediate % (n)	Resistant % (n)
Amoxicillin-clavulanic acid	30µg	100 (12)	0	0
Ampicillin	25µg	100 (12)	0	0
Enrofloxacin	5µg	25 (3)	41.66 (5)	33.33 (4)
Erythromycin	15µg	50 (6)	50 (6)	0
Gentamicin	10µg	0	0	100 (12)
Chloramphenicol	30µg	83.33 (10)	16.66 (2)	0
Lincomycin	2µg	58.33 (7)	25 (3)	16.66 (2)
Neomycin	30µg	0	0	100 (12)
Oxytetracycline	30µg	83.33 (10)	0	16.66 (2)
Penicillin G	10 IU	100 (12)	0	0
Rifamycin	30µg	91,66 (11)	8.33 (1)	0
Cefoperazone	75µg	100 (12)	0	0
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	25µg	75 (9)	25 (3)	0

n: number of *S. canis* isolates

Discussion

Pets and people often live in close contact, and in recent years, the 'one health' concept has become increasingly important due to zoonotic infections. It has been confirmed that the bacteria of the genus *Streptococcus* can cause serious or fatal diseases in pets and humans, some confirmed to be zoonotic (Lam et al. 2007; Fulde et al. 2013; Pinho et al. 2013; Lacave et al. 2016; Mališová et al. 2019). In particular, it has been reported that *S. canis* causes serious or fatal zoonotic infections in dog owners, and their constant contact with dogs' vaginal discharge can be a potential source for the risk of streptococcal disease, which is a concern for public health (Olufemi et al. 2017). However, due to the phenotypic, biochemical, and genetic similarities between this bacterial agent and other *Streptococcus* species, there are still uncertainties in its identification. Therefore, in this study, a total of 12 β -hemolytic *Streptococcus* sp. isolates obtained from the vaginal discharge of infected dogs (n=11) and the wound lesion of one dog were grouped according to Lancefield serogrouping, and some phenotypic and biochemical properties were evaluated. In addition, the identified isolates were confirmed by PCR testing in terms of the presence of species-specific genes, and their susceptibility to some antimicrobial agents was determined.

All isolates were determined to be in Group G according to Lancefield serogrouping and evaluated as *S. canis* according to the description of Devriese et al. (1986). Some researchers (Devriese

et al. 1986; Hassan et al. 2005; Lysková et al. 2007) reported a difference in the phenotypic properties and biochemical test results of *S. canis*. However, no significant differences were observed in this study. The CAMP-like reaction, an important phenotypic feature of *S. canis*, was positive in all isolates (n=12). Although this result is consistent with the findings of Hassan et al. (2005), it differs from those of Devriese et al. (1986) and Lysková et al. (2007), who reported that a CAMP-like reaction was not present in all *S. canis* isolates (n=31) and 36 of 86 *S. canis* isolates, respectively. Another investigated phenotypic feature of *S. canis* was esculin hydrolysis. In the current study, contrary to the results of other researchers (Devriese et al. 1986; Hassan et al. 2005; Lysková et al. 2007), all the isolates (n=12) were negative for esculin hydrolysis. Devriese et al. (1986) found that all *S. canis* isolates (n=31) were positive for esculin hydrolysis, and Hassan et al. (2005) reported that esculin hydrolysis was positive in subcultures, despite being negative at first isolation. On the other hand, Lyskova et al. (2007) showed that esculin hydrolysis was positive in only 14 of 86 *S. canis* isolates. In addition, while Devriese et al. (1986), Hassan et al. (2005), and Lam et al. (2007) consistently obtained negative results for hippurate hydrolysis in *S. canis* isolates, Lysková et al. (2007) reported that only one of 86 *S. canis* isolate was hippurate-positive. In this study, hippurate hydrolysis was negative in all *S. canis* strains consistently with the results of Devriese et al. (1986), Hassan et al. (2005), and Lam et al. (2007).

When the carbohydrate fermentation test results were examined, it was found that lactose and sucrose fermentation was positive and raffinose and sorbitol fermentation was negative, which is in agreement with the results of previous studies (Devriese et al. 1986; Hassan et al. 2005; Lyskova et al. 2007). On the other hand, Hassan et al. (2005) reported that the fermentation of salicin was negative, but in the current study, consistent with Devriese et al. (1986), we determined all *S. canis* isolates (100%) were positive for salicin fermentation. In addition, previous researchers reported different results in relation to mannitol and trehalose fermentation (Devriese et al. 1986; Hassan et al. 2005; Lyskova et al. 2007). Hassan et al. (2005) found mannitol and trehalose fermentation to be negative; Devriese et al. (1986) reported that trehalose fermentation was positive in only four of 31 *S. canis* isolates but mannitol fermentation was negative in all isolates, and Lysková et al. (2007) detected trehalose fermentation in 13 of 86 *S. canis* isolates and mannitol fermentation in only one sample. In the current study, similar to the findings of Lysková et al. (2007), nine of 12 isolates were positive for trehalose fermentation and four for mannitol fermentation. We consider that these variations reported in biochemical tests may be due to the epidemiological differences between the countries in which the studies were undertaken. In addition, it has been reported that streptococcal isolates may vary according to the characteristics of the host and disease from which the streptococcal isolates are isolated (Devriese et al. 1986; Jensen and Kilian 2012; Richards et al. 2012). In this study, the lack of significant differences between the streptococcus isolates in terms of phenotypic and biochemical properties may be similarly related to host or disease characteristics or the low number of isolates.

It has been reported that *S. canis* have biochemical and genetic similarities to *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, and *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (Efstratiou et al. 1994; Jensen and Kilian 2012; Lefébure et al. 2012), and there may be genetic transmission between different species (Richards et al. 2012; Pinho et al. 2013). In the literature (Hassan et al. 2003, 2005), it has been suggested that ISR as a species-specific gene can be used in the identification of *S. canis* whereas the *sodA_{int}* gene is not found in non-*S. canis* streptococcus strains, and therefore can be an important indicator in distinguishing *S. canis* from other *Streptococcus* species. However, Moriconi et

al. (2017) reported the presence of the ISR gene region in one *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain and one *S. pyogenes* strain. The authors also noted that the *sodA_{int}* gene could be used in the accurate identification of *S. canis* strains (Moriconi et al. 2017). In the current study, considering that the use of one primer pair could lead to suspicions or misidentification, the presence of ISR and *sodA_{int}* was investigated in order to verify the *S. canis* isolates by PCR, and both gene regions were detected in all isolates. This result supports the findings of previous studies (Hassan et al. 2003, 2005), reporting that these genes can be used in the fast and reliable identification of *S. canis*. However, based on the research results reported by Moriconi et al. (2017), we concluded that the presence of ISR and *sodA_{int}* gene should be investigated in a higher number of *S. canis* isolates for an accurate identification by the PCR test.

Consistent with the literature, the results of this study revealed the susceptibility of *S. canis* isolates to amoxicillin-clavulanic acid, cefoperazone (Hassan et al. 2005), ampicillin (Lysková et al. 2007), and penicillin G (Chaffer et al. 2005; Hassan et al. 2005; Lysková et al. 2007; Pedersen et al. 2007). In contrast, in accordance with the results of other research (Bagcigil et al. 2004; Chaffer et al. 2005; Hassan et al. 2005), all of our isolates (100%) were found to be resistant to gentamicin and neomycin, which is an expected finding for *Streptococcus* sp., although Olufemi et al. (2017) detected gentamicin resistance in only 50% of their isolates. In addition, in the current study, only two (16.66%) of the 12 *S. canis* isolates were found to be resistant to oxytetracycline in contrast to Pedersen et al. (2007), who reported the highest level of resistance to tetracycline (27% of 37 *S. canis* isolates) and Lysková et al. (2007), who calculated the rate of tetracycline resistance as 29.2% in 86 *S. canis* isolates. In another study, Diren Sığircı et al. (2012) reported that the *S. canis* strain isolated from a dog's urinary tract infection was susceptible to oxytetracycline. Another finding of the current study was that 25% of the *S. canis* isolates were susceptible to enrofloxacin, 83.33% to chloramphenicol, 58.33% to lincomycin, 91.66% to rifamycin, and 75% to trimethoprim-sulfamethoxazole, while erythromycin susceptibility was seen in 50% of the isolates and moderate erythromycin susceptibility in the other half of the sample. Although these results are generally compatible with the findings of other researchers (Chaffer et al. 2005; Hassan et al. 2005; Lysková et al. 2007; Pedersen et al. 2007; Diren Sığircı et al. 2012),

the susceptibility of the isolates to enrofloxacin and erythromycin were lower than those previously reported. This result also supports the result of a previous study, which reported that the macrolide/lincosamide resistance rates have been increasing rapidly in *S. canis* strains (Fukushima et al. 2019).

Conclusion

We conclude that the identification of *S. canis* can be made more accurately and faster by detecting species-specific ISR and *sodA_{int}* genes. In addition, unlike *Staphylococci* and *Enterobacteriaceae*, pets infected with *S. canis* were still susceptible to antibiotics commonly used in veterinary medicine. However, in this study, the sensitivity of *S. canis* isolates to enrofloxacin and erythromycin was found to be much lower than previously reported in the literature, indicating their potential to develop resistance to macrolides and quinolones, which warrants periodical monitoring of antibiotic resistance development in *S. canis* isolates. In addition, this result may be an epidemiological indicator of antibiotic use. Therefore, antibiotic susceptibility should be determined before treatment in order to apply the correct treatment protocol for infections caused by *S. canis*. In critical cases where this may not be possible, we suggest that amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin, cefoperazone, and penicillin G should be among the first antimicrobial agents to be preferred in the treatment of *S. canis* infections. Considering that *S. canis* is a zoonotic bacterium, possible human infections can be eliminated by preventing the transmission of *S. canis* to animal owners through a rapid and identification of related infections and their treatment with sensitive antibiotics.

Conflict of Interest: The authors declared that there is no conflict of interest. This research received no grant from any funding agency/sector.

Ethic statement: This study does not present any ethical concerns.

References

- Abma E, Vandenaabeele S, Campos M, Bosnians T, Stock E, De Rooster H. (2013) Necrotizing fasciitis in a dog. *Vlaams Diergeneeskund Tijdschr.* 82, 134-142.
- Avki S, Türütoğlu H, Temizsoy MD, Yiğitaslan K. (2008) Bir köpekte streptokokal toksik şok sendromu: *Streptococcus canis*- et yiyen bakteri. *Vet Cerrahi Derg.* 14, 24-26.
- Bagcigil AF, Kirsan I, İkiz S, Ozgur NY. (2004) Bacteriological examination of the bitches with pyometra. *Medycyna Wet.* 60, 934-936.
- Bert F, Lambert-Zechovsky N. (1997) Septicemia caused by *Streptococcus canis* in a human. *J Clin Microbiol.* 35, 777-779.
- Besli Y, Ayas M, Karatuna O, Akyar I. (2018) Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry with VITEK2 Gram positive system for identification of beta hemolytic streptococci. *J Immunol Clin Microbiol.* 3(1), 1-7.
- Chaffer M, Friedman S, Saran A, Younis A. (2005) An outbreak of *Streptococcus canis* mastitis in a dairy herd in Israel. *N Z Vet J.* 53, 261-264.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; 4th ed. CLSI supplement VET08 CLSI Wayne, PA, USA
- Devriese LA, Hommez J, Kilpper-Balz R, Schleifer KH. (1986) *Streptococcus canis* sp. nov.: A species of group G streptococci from animals. *Int J Syst Bacteriol.* 36, 422-425.
- DeWinter LM, Prescott JF. (1999) Relatedness of *Streptococcus canis* from canine streptococcal toxic shock syndrome and necrotizing fasciitis. *Can J Vet Res.* 63, 90-95.
- Diren Sığırıcı B, Koenhemsı L, Gönül R, Uysal A, Özgür NY. (2012) Bir köpeğin idrar yolu infeksiyonunda saptanan *Acinetobacter baumannii* ve *Streptococcus canis*. *Istanbul Univ Vet Fak Derg.* 38, 73-78.
- Efstratiou A, Colman G, Hahn G, Timoney JF, Boeufgras JM, Monget D. (1994) Biochemical differences among human and animal streptococci of Lancefield group C or group G. *J Med Microbiol.* 41, 145-148.
- Fukushima Y, Tsuyuki Y, Goto M, Yoshida H, Takahashi T. (2019) Species identification of β -hemolytic streptococci from diseased companion animals and their antimicrobial resistance data in Japan (2017). *Jpn J Infect Dis.* 72(2), 94-98.
- Fulde M, Rohde M, Polok A, Preissner KT, Chhatwal GS, Bergmann S. (2013) Cooperative plasminogen recruitment to the surface of *Streptococcus canis* via M protein and enolase enhances bacterial survival. *mBio.* 4(2): e00629-12.
- Galpérine T, Cazorla C, Blanchard E, Boineau F, Ragnaud JM, Neau D. (2007) *Streptococcus canis* infections in humans: Retrospective study of 54 patients. *J Infect.* 55, 23-26.
- Glassman AR, Ramachandran A, Lyon SD, Robertson J, Kanda I, Brandão J. (2020) Streptococcal toxic shock syndrome in a captive kinkajou (*Potos flavus*). *J Exot Pet Med.* 33, 42-45.
- Hassan AA, Akineden Ö, Usleber E. (2005) Identification of *Streptococcus canis* isolated from milk of dairy cows with subclinical mastitis. *J Clin Microbiol.* 43(3), 1234-1238.
- Hassan AA, Khan IU, Abdulmawjood A, Lämmle C. (2003) Development of PCR assays for detection of *Streptococcus canis*. *FEMS Microbiol Lett.* 219, 209-214.
- Jensen A, Kilian M. (2012) Delineation of *Streptococcus dysgalactiae*, its subspecies, and its clinical and phylogenetic relationship to *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol.* 50, 113-126.
- Lacave G, Coutard A, Troché G, Augusto S, Pons S, Zuber B, Laurent V, Amara M, Couzon B, Bédos JP, Pangon B, Grimaldi D. (2016) Endocarditis caused by *Streptococcus canis*: an emerging zoonosis? *Infection.* 44, 111-114.
- Lam MM, Clarridge JE, Young EJ, Mizuki S. (2007) The other group G streptococcus: Increased detection of *Streptococcus canis* ulcer infections in dog owners. *J Clin Microbiol.* 45(7), 2327-2329.
- Lamm CG, Ferguson AC, Lehenbauer TW, Love BC. (2010) Streptococcal infection in dogs: A retrospective study of 393 cases. *Vet Pathol.* 47, 387-395.

- Lefébure T, Richards VP, Lang P, Pavinski-Bitar P, Stanhope MJ. (2012) Gene repertoire evolution of *Streptococcus pyogenes* inferred from phylogenomic analysis with *Streptococcus canis* and *Streptococcus dysgalactiae*. *PLoS One*. 7(5), e37607.
- Lysková P, Vydřalová M, Královcová D, Mazurová J. (2007) Prevalence and characteristics of *Streptococcus canis* strains isolated from dogs and cats. *Acta Vet Brno*. 76, 619-625.
- Mališová B, Šantavý P, Lovečková Y, Hladký B, Kotásková I, Pol J, Lonský V, Němec P, Freiburger T. (2019) Human native endocarditis caused by *Streptococcus canis*-a case report. *APMIS*. 127(1), 41-44.
- Moriconi M, Acke E, Petrelli D, Preziuso S. (2017) Multiplex PCR-based identification of *Streptococcus canis*, *Streptococcus zooepidemicus* and *Streptococcus dysgalactiae* subspecies from dogs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 50, 48-53.
- Nybakken EJ, Oppegaard O, Gilhuus M, Jensen CS, Mylvaganam H. (2021) Identification of *Streptococcus dysgalactiae* using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry; refining the database for improved identification. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 99(1), 115207. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115207>
- Ohtaki H, Ohkusu K, Ohta H, Miyazaki T, Yonetamari J, Usui T, Mori I, Ito H, Ishizuka T, Seishima M. (2013) A case of sepsis caused by *Streptococcus canis* in a dog owner: A first case report of sepsis without dog bite in Japan. *J Infect Chemother*. 19, 1206-1209.
- Olufemi F, Okpara E, Akinduti P, Ojo EO, Nwata JA. (2017) Vaginal carriage of antimicrobial resistant Lancefield group G streptococci among dogs in Lagos Metropolis, Nigeria. *Alexandria J Vet Sci*. 54, 8-12.
- Pedersen K, Pedersen K, Jensen H, Finster K, Jensen VF, Heuer OE. (2007) Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. *J Antimicrob Chemother*. 60, 775-781.
- Pesavento PA, Bannasch MJ, Bachmann R, Byrne BA, Hurley KF. (2007) Fatal *Streptococcus canis* infections in intensively housed shelter cats. *Vet Pathol*. 44, 218-221.
- Pinho MD, Matos SC, Pomba C, Lübke-Becker A, Wieler LH, Preziuso S, Melo-Cristino J, Ramirez M. (2013) Multilocus sequence analysis of *Streptococcus canis* confirms the zoonotic origin of human infections and reveals genetic exchange with *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *J Clin Microbiol*. 51, 1099-1109.
- Richards VP, Zadoks RN, Pavinski Bitar PD, Lefébure T, Lang P, Werner B, Tikofsky L, Moroni P, Stanhope MJ. (2012) Genome characterization and population genetic structure of the zoonotic pathogen, *Streptococcus canis*. *BMC Microbiol*. 12, 293.
- Schabauer L, Wenning M, Huber I, Ehling-Schulz M. (2014) Novel physico-chemical diagnostic tools for high throughput identification of bovine mastitis associated gram-positive, catalase-negative cocci. *BMC Vet Res*. 10, 156. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-156>
- Sharma B, Srivastava MK, Srivastava A, Singh R. (2012) Canine streptococcal toxic shock syndrome associated with necrotizing fasciitis: An overview. *Vet World*. 5, 311-319.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2019): Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf, Accessed 22.05.2019.
- Tikofsky LL, Zadoks RN. (2005) Cross-infection between cats and cows: Origin and control of *Streptococcus canis* mastitis in a dairy herd. *J Dairy Sci*. 88, 2707-2713.
- Whatmore AM, Engler KH, Gudmundsdottir G, Efstratiou A. (2001) Identification of isolates of *Streptococcus canis* infecting humans. *J Clin Microbiol*. 39, 4196-4199.
- Whiley RA, Hardie JM. (2009) Taxonomic outline of the phylum Firmicutes. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB. eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York. p. 655-711.
- Woo PC, Fung AM, Lau SK, Wong SS, Yuen KY. (2001) Group G beta-hemolytic streptococcal bacteremia characterized by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *J Clin Microbiol*. 39, 3147-3155.



Production of polyclonal antibodies against Turkey FMDV strains

Beyhan Sareyyüpoğlu¹

¹ FMD (Sap) Institute, Çankaya, Ankara, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 18.12.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 03.05.2021

Abstract: Antibodies (Abs) have been one of the most important tools in diagnostic laboratories. Many diagnostic techniques such as Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assays (ELISA), immunofluorescence, Ab-microarray platforms, immunoblots, X-ray crystallography require the Abs. ELISA is an assay method that is among the basic tests using antibodies for the serology of Foot and Mouth Disease (FMDV). This method requires polyclonal or monoclonal antibodies to detect FMDV antigen or antibodies. For this purpose, solid-phase competitive ELISA (SPCE) or liquid phase blocking ELISA (LPBE) and non-structural protein (NSP) ELISA are used. SPCE and LPBE have mainly used FMDV structural protein antibody (SP-Ab) detection.

In this study, it was aimed to produce a polyclonal Ab against FMDV ANep84 (Genotype VII) and OTUR07 (OPanAsia II), ATUR11 (A Iran05) strains for LPBE, FMDV SP-Ab detection. For this purpose, four guinea pigs and six rabbits were used for each serotype of FMDV. After producing Abs, checkerboard ELISA titration was performed to determine the optimal test dilution of Abs. Backgrounds, cross-reactions against three strains of FMDV were also checked. In conclusion, polyclonal Abs were produced against FMDV ANep84 (Genotype VII) and O Tur07 (O Pan Asia II), ATUR11 (A Iran05) strains, and standardized for LPBE test.

Keywords: ELISA, FMD, polyclonal antibodies

Türkiye’de Şap virüsü şuşlarına karşı poliklonal antikor üretimi

Özet: Antikorlar tanı laboratuvarlarında daima önemli bir yer tutmaktadır. Enzim işaretli bağışıklık testleri (ELISA), immunofloresan, antikor-mikroarray platformları, immunoblotlar, X-ışını kristalografisi gibi birçok tanı tekniği kullanımı antikorların varlığını gerektirir. Şap hastalığı serolojisinde antikorların kullanıldığı temel test ELISA’dır. ELISA testleri şap virusu antijenini veya şap virusuna karşı organizmada oluşan antikorları tespit etmek için poliklonal veya monoklonal antikorlara ihtiyaç duyar. Bu amaçla, solid faz kompetitif ELISA (SPCE) ve likit faz bloking ELISA (LPBE) ve yapısal olmayan (NSP) ELISA yöntemleri kullanılır. Şap virusunun yapısal proteinlerine (SP) karşı oluşan antikorları tespit etmek için ise SPCE ve LPBE testleri kullanılır.

Bu çalışmada, ANep84 (genotip VII), O TUR07 (O Pan Asia II), ATUR11 (A Iran05) şap virusu şuşlarına karşı LPBE testinde kullanılmak üzere poliklonal antikor üretmek amaçlandı. Bu amaçla, her bir FMDV serotipi için dört adet kobay ve altı adet tavşan kullanıldı. Antikorlar üretildikten sonra, dama tahtası (checkerboard ELISA titration) testi ile üretimi yapılan poliklonal antikorlar için optimal dilasyonlar belirlendi. Şap virusu şuşlarına karşı oluşabilecek çapraz reaksiyonlar ve background reaksiyonları kontrol edildi. Sonuç olarak, bu çalışmada şap virusu ANep84 (genotip VII) ve O Tur07 (O Pan Asia II), ATUR11 (A Iran05) şuşlarına karşı poliklonal antikorlar üretildi ve LPBE testi için standardizasyonları yapıldı.

Anahtar kelimeler: ELISA, poliklonal antikorlar, şap hastalığı

Introduction

FMD is a highly contagious viral disease which affects the cloven-hooved animals causing serious economic losses (Fry et al. 2005; Diaz San Segundo et al. 2017). FMDV is a small positive-sense RNA virus. The capsid of the FMDV consists of a combination of protomers and pentamers to form an icosahedral structure (Jamal and Belsham 2013).

Serological tests for FMDV began to gain momentum with the 1980s via ELISA (Hamblin

et al. 1986). For this aim, OIE (World Organisation for Animal Health) defined two ELISAs for SP-Ab detection; solid-phase competitive ELISA (SPCE) or liquid phase blocking ELISA (LPBE) (Hamblin et al. 1986; Sorensen et al. 1998; Anonymus 2019). These tests are used to determine an FMD infected animal and/or a vaccinated animal via the polyclonal or monoclonal Abs. Polyclonal Abs are used in the LPBE. It requires two types of Abs; one of them is the capturing Ab produced in rabbits and another one is the detecting Ab produced in guinea pigs.

The main beneficial properties of polyclonal Abs are their clonal and biophysical diversity. Its' poly-clonality allows the binding of multiple antigenic determinants. Its' biophysical diversity allows greater stability when the environmental challenges may cause inactivation of antibody, lability, or precipitation of other forms of antibodies (Harlow and Lane 1988; Leenars et al.1999; Leenars and Hendriksen 2005; Lipman et al. 2005; Voskuil 2014; Ascoli and Aggeler 2018). Cross-reactions and non-specific backgrounds are two main difficulties in the usage of the polyclonal Abs for the serological tests. To minimize the cross-reaction problem, purification of Abs can be tried. However, Ab purification is a costly and labor-consuming process (Low et al. 2006). The background problem can be mitigated by further diluting the antibody or blocking it. Thus, the lower affinity interactions will not work with lower Ab concentrations. Proper blocking conditions can help to prevent low-affinity Ab interactions (Voskuil 2014).

The purpose of the study is to produce polyclonal Abs (capturing and detecting Abs for FMDV Turkey (ANep84 (Genotype VII), OTur07 (O Pan Asia II), ATUR11 (Alran05) FMDV strains and standardize them for LPBE.

Materials and Methods

Preparation of immunization antigen: 146S particles of FMDV strains were used as an immunization antigen. Baby Hamster Kidney (BHK-21) cell line was used for virus propagation. After that, a propagated virus was concentrated with poly-ethylene glycol (PEG) and collected by the sucrose density gradient method. The 146S content of antigens was determined as described by the method of Barteling and Melen (Barteling and Melen 1974).

Calculation of immunization antigen quantity in each dose: For this aim, first, the total animal number defined in the study. Then, antigen quantity determination in each dose. After that, Freund's

complete (first immunization) and incomplete (the second immunization adjuvants were added to the antigen stocks respectively. For this purpose, the $(n1.v1=n2.v2)$ formula was used for the calculation of each animal immunization antigen dose (Zum Dahl and De Coste 2009). n1:the antigen quantity of 146S particle spectrophotometrically ($\mu\text{g/ml}$), v1: the required amount of antigen taken from stock antigen solution (ml), n2: the required amount of antigen in a rabbit or a guinea pig dose ($\mu\text{g/ml}$), it is 20 $\mu\text{g/ml}$ for rabbit and 10 $\mu\text{g/ml}$ for guinea pig v2: the total prepared volume of 146S antigen (ml).

Animals: Free ranged guinea pigs (Duncan Hurtley breed, 600 g, 4 months old, female) and rabbits (California breed, 1.5 kg, 3 months old, female) were used for immunizations, respectively.

Immunization of animals: A total of 0.5 ml antigen and adjuvant were inoculated subcutaneously into the right and left abdomen of rabbit or guinea pig. Detailed information about immunization antigens is shown in Table 1. One month (28 days after the first dose, second dose implemented) apart-double booster immunization schedule was used (Ferris and Donaldson 1984; Have 1984; Harlow and Lane 1988; Lipman et al. 2005). After 15 days after the second immunization, the animals were ceased.

Table 1. Serotype, strain, and 146S antigen quantity of immunization antigens

Serotype	Strain	146 S-spectrophotometric quantity
O	O Tur 07 (O PanAsia II)	250 $\mu\text{g/ml}$
A	ANepal 84 (Genotype VII)	350 $\mu\text{g/ml}$
A	ATUR11 (A Iran 05)	690 $\mu\text{g/ml}$

Blood sample collection: After blood centrifugation at 3000 rpm for 10 min, sera were separated. First, each serum was tested with LPBE for titer and then pooled. After that, sera were stored at -20°C until tests. A total of 50% percent glycerol and 0.002% sodium azide were added to the sera. The total yielding amount and storage conditions of produced antiserums are shown in the Tables below (Tables 2 and 3).

Table 2. Total yielding amount and storage conditions of capturing (rabbit) Abs

Serotype/strain	Storage conditions	Total amount
O TUR07	-80°C with sodium azide 0.002% and 50% glycerol, 0.5 ml cryotube	113 ml
ATUR11	-80°C with sodium azide 0.002% and 50% glycerol, 0.5 ml cryotube	140 ml
A Nepal84	-80°C with sodium azide 0,002% and 50% glycerol, 0.5 ml cryotube	110 ml

Table 3. Total yielding amount and storage conditions of detecting (guinea pig) Abs

Serotype/strain	Storage conditions	Total amount
O TUR 07	-80°C with sodium azide 0,002% and 50% glycerol, 0.5 ml cryotube	60 ml
A TUR11	-80°C with sodium azide 0,002% and 50% glycerol, 0.5 ml cryotube	50 ml
A Nepal84	-80°C with sodium azide 0,002% and 50% glycerol, 0.5 ml cryotube	55 ml

Standardization of produced polyclonal serum:

Checkerboard titration ELISA was performed to determine optimal test dilution of polyclonal Abs (Crowther 2001). For this aim, the rabbit Ab was diluted two-fold from the left to the right line of the ELISA plate starting from the initial dilution at a rate of 1/125. After incubation at 4°C overnight, the plate was washed with Dulbecco PBS with six cycles, and the appropriate reference virus with optimal dilution rate is added to all plate wells and kept in the 37°C incubator for one hour. After washing cycles, the guinea pig Ab was diluted two-fold from the upper to the bottom line of the plate starting from the initial dilution at a rate of 1/62.5. After washing cycles, then the conjugate (HRP-labeled polyclonal rabbit anti-guinea pig IgGs, P0141 DAKO) was added to the plate and kept in the 37°C incubator for one hour. After washing cycles, the chromogen substrate (OPD) was added. The reaction was stopped by sulphuric acid (1.25 M sulphuric acid) after 15 minutes at room temperature. The colour change was read in the ELISA reader (Versamax, Molecular Devices) at a wavelength of 492 nm.

To control the cross-reaction and backgrounds between the FMDV serotypes, a sandwich ELISA was performed. For this purpose, plates were coated with optimal dilution (well A-D) of capturing rabbit antibodies according to final checkerboard dilution titers of each serotype of FMDV antibodies (1/5000). Then, to check cross-reactions of FMDV OTUR07 with the other FMDV strains (ANepal and ATUR11), optimal dilution of FMDV OTUR07 was added to (well A-B). After that, optimal dilutions of FMDV A TUR11 and FMDV ANepal were added to wells C and D, respectively. Similar to the OTUR07 cross reaction study, the same steps were performed to detect cross-reactions of FMDV ATUR11 and ANepal with other FMDV serotypes. 11-12 wells were left as a background control well. After one hour at 37°C incubation, plate washed, and FMDV detecting antibodies were added to the plate and incubated at the same condition. After washing cycles, the conjugate (DAKO, P0141 rabbit anti

guinea pig immunoglobulins/HRP) was added to the plate. After that, the same steps were followed as described above in the checkerboard board ELISA titration.

To reduce nonspecific-cross and background reactions guinea pig serum was blocked with normal rabbit (Sigma Aldrich) serum in 1/1 ratio at 37°C water bath at 1 hour.

Results

The total amounts of polyclonal sera obtained after immunizations and storage conditions of Abs were given in Tables 3 and 4. Dilution rates of capturing and detecting polyclonal Abs for LPBE were determined as 1/8000 for capturing (rabbit Ab) and 1/2000 for detecting (guinea pig Ab) according to the checkerboard ELISA titration result. The final dilution rate was preferred more concentrated than the determined dilution rates for test reliability. Therefore, it was accepted as 1/5000 for rabbit and 1/1000 for guinea pig Abs. Checkerboard titration test results of rabbit and guinea pig Abs were shown in Figures 1 and 2, respectively. Cross reaction results of sandwich ELISA between the FMDV serotypes and background control are shown in Figure 3.

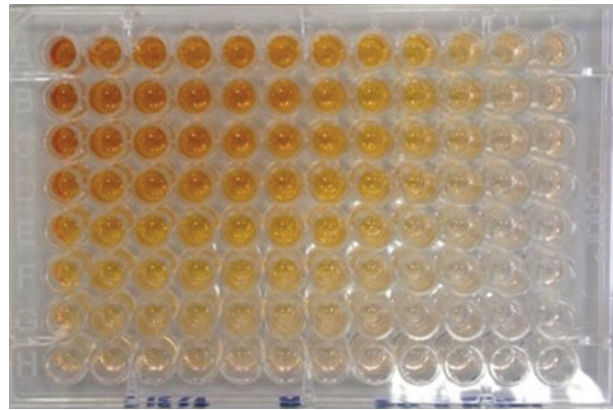
**Figure 1.** Rabbit or guinea pig-conjugate checkerboard study

Figure shows the colour change in the checkerboard titration.

Figure 2. Checkerboard titration results of rabbit and guinea pig antibodies

FMDV OTUR 07	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	2,7237	2,6896	2,6248	2,8141	2,3129	2,3037	2,1351	1,8398	1,6291	1,2471
	2,5377	2,4401	2,4297	2,3964	2,0838	1,9142	1,87	1,5643	1,5061	1,1767
Rabbit Ab starting 1/125 titer from-left to right line	2,4204	2,3029	2,2513	2,2412	2,1107	1,9318	1,6086	1,5869	1,3921	1,2065 guinea pig Ab:1/2000
FMDV O ref virus 1/300 dilution rate all wells	2,6219	2,4715	2,4472	2,443	2,1828	2,0341	1,9805	1,6472	1,3758	1,1282 rabbit Ab: 1/8000
Guinea pig Ab 1/62,5 from top to bottom line	2,193	2,0888	2,0477	2,1784	1,8122	1,7024	1,5423	1,4178	1,2325	1,0097
Conjugate commercial 1/2000 constant dilution rate	2,3475	2,2444	2,1948	2,3154	1,8694	1,6769	1,6605	1,3536	1,218	1,0502
	2,4197	2,3939	2,2107	2,2319	1,9661	1,8513	1,6149	1,499	1,2646	1,1181
	1,5171	1,4272	1,5383	1,5823	1,3713	1,2178	1,0688	0,9098	0,8589	0,6145
FMDV A TUR11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	3,496	3,4696	3,4352	3,4023	3,2599	3,034	2,9244	2,5713	2,3856	1,8473
Rabbit Ab starting 1/125 titer from-left to right line	3,2486	3,1455	3,1078	2,9726	2,6283	2,5346	2,5098	2,2421	2,0164	1,5341 guinea pig Ab:1/2000
FMDV A TUR11 ref virus 1/512 dilution rate all wells	2,9824	2,5289	2,7276	2,5554	2,3814	2,2423	2,291	1,9966	1,6551	1,3753 rabbit Ab: 1/8000
Guinea pig Ab 1/62,5 from top to bottom line	2,9369	2,7527	2,7034	2,6224	2,3596	2,1811	1,9963	1,8557	1,6414	1,3465
Conjugate commercial 1/2000 constant dilution rate	2,375	2,202	2,2	2,0042	1,712	1,638	1,3927	1,366	1,2065	1,2272
	2,197	2,0678	2,0219	2,0042	1,8255	1,542	1,31	1,3674	1,2151	0,9522
	2,1507	1,9719	1,9653	1,8311	1,7072	1,3625	1,5581	1,4077	1,2581	1,0491
	1,8916	1,9007	1,9584	1,7909	1,4924	1,5185	1,4145	1,2476	1,1423	0,9267
FMDV A Nepal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	3,4309	3,2547	3,3423	3,0188	3,2508	2,7778	2,6438	2,128	1,5309	1,0183
	2,9283	2,8411	2,7925	2,6083	2,5159	2,2924	2,1909	1,6996	1,2638	0,8735
Rabbit Ab starting 1/125 titer from-left to right line	2,5351	2,463	2,2434	2,0979	2,1244	1,9706	1,9158	1,6516	1,1876	0,8494 guinea pig Ab:1/2000
FMDV A nepal virus 1/450 dilution rate all wells	2,7099	2,5791	2,5298	2,3238	2,3751	2,2624	2,1304	1,7635	1,1809	0,8089 rabbit Ab: 1/8000
Guinea pig Ab 1/62,5 from top to bottom line	2,517	2,4102	2,522	2,2697	2,2823	2,1362	2,017	1,7482	1,3998	0,8921
Conjugate commercial 1/2000 constant dilution rate	2,4524	2,4187	2,4147	2,3035	2,4478	2,2852	2,2124	1,7235	1,3592	0,9335
	2,9026	2,6331	2,4465	2,7438	2,6371	2,791	2,29	1,8017	1,456	0,9693
	2,7945	2,3328	2,2501	2,3465	2,3362	2,2266	2,0686	1,6111	1,1376	0,8266

Grey zones in the plates show the best optimal dilution curve of checkerboard titration.

Discussion and Conclusion

The rapid development of a unique diagnostic kit against FMDV is troublesome because of the continuous mutations in FMDVs and the risk of entrance for exotic FMDV strains from the neighboring countries of Turkey. It is necessary to produce Abs (polyclonal and/or monoclonal) for FMDV SP ELISA tests against each of newly emerged, genotypically crucial, exotic strains of FMDV just like the effort of a new primer-probe design for the molecular differentiation of novel FMDV with PCR. However, the period for the production of polyclonal Abs for FMDV serology takes a long time and laborious work (Parida 2009; Lavoria et al. 2012; Sala et al. 2018; Salem et al. 2019).

In the present study, the complete production and standardization process of Abs take approximately three months for each FMDV serotype. Besides, cross-reactions were detected among the FMDV serotypes in ELISA (Figure 3). Cross-reactions between the FMDV Abs is a possible problem due to the common sharing epitopes between the FMDV serotypes strains (Parida 2009; Bari et al. 2014; Ascoli and Aggeler 2018; Salem et al. 2019). Here, additional blocking steps were performed to alleviate cross-reactions. To mitigate

high backgrounds, the dilution of polyclonal sera was also tried, and then the optimum dilution was determined for each Ab via checkerboard test to provide minimum background and cross-reactions.

Besides the time-consuming production and standardization process, animal usage for the production of polyclonal Abs is already contradictory to the 3R concept (Russell and Burch's 1959). Therefore, alternative tests or serological approaches were searched for FMDV-SP Abs detection in recent years. For this purpose, a monoclonal Ab-based antigen and Ab detection kits were developed by Brocchi (Brocchi 2012). However, Brocchi reported that imperfect FMDV type specificity and a different assay standardization for each FMDV serotype are some test limitations of these kits. In addition to monoclonal Ab based kits, a cocktail of polyclonal or monoclonal Abs usage, chimeric antibodies, recombinant Ab production, virus-like particles, or recombinant proteins have also been studied (Ko et al. 2009; Yang et al. 2017; Cao et al. 2018, Ran et al. 2019).

In conclusion, routine tests for detection of FMDV-SP antibody are still based on polyclonal and monoclonal Abs production. However, there is not adequate study about polyclonal Ab production

and standardization. The present study was carried out primarily to focus on polyclonal Ab production steps in general. Polyclonal Abs were produced

against Turkey FMDV strains and standardized for LPBE test. A further study needs to determine the purity of Abs via Western Blotting

Figure3. Background and cross-reaction control in the optimal dilution of antibodies.

											Cross control			
FMDV OTUR 07	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	virus	
A	2,3291	2,3985	2,2309	2,2056	2,0094	1,9036	1,7875	1,6729	1,4808	1,1906	0,0693	0,0793	OTUR07	
<i>1/5000 Rabbit antibody-1/1000 guinea pig antibody</i>	B	2,1387	2,2558	2,215	2,0304	2,0291	1,834	1,7858	1,6644	1,4201	1,1314	0,064	0,0698	OTUR07
C	0,2424	0,253	0,2606	0,2693	0,2438	0,2045	0,1672	0,1515	0,1232	0,1026	0,0632	0,0687	ATUR11	
D	0,4306	0,3677	0,3045	0,3013	0,226	0,2145	0,1662	0,1362	0,1124	0,0974	0,0619	0,0718	ANEPAL	
FMDV A TUR11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	background	background	virus	
A	1,5172	1,8986	1,927	1,7962	1,8931	1,9956	1,7776	1,3981	1,014	0,7022	0,0771	0,0792	ATUR11	
<i>1/5000 Rabbit antibody-1/1000 guinea pig antibody</i>	B	0,381	0,2381	0,1841	0,1386	0,1145	0,1092	0,1052	0,116	0,1047	0,1152	0,0778	0,0821	ATUR11
C	0,3591	0,3622	0,3432	0,3082	0,2828	0,3062	0,2917	0,276	0,2545	0,2229	0,0825	0,0908	OTUR07	
D	0,265	0,2614	0,2715	0,235	0,2207	0,1904	0,1772	0,1592	0,1478	0,1313	0,0943	0,1009	A NEPAL	
FMDV A Nepal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	background	background	virus	
A	2,3538	2,285	2,347	1,9889	1,9626	1,8389	1,7156	1,5777	1,2303	0,819	0,0881	0,0833	A NEPAL	
<i>1/5000 Rabbit antibody-1/1000 guinea pig antibody</i>	B	2,4543	2,3589	2,2761	2,1945	1,9096	1,8833	1,8054	1,5989	1,1749	0,8235	0,0733	0,0719	A NEPAL
C	0,2451	0,2386	0,288	0,2785	0,2621	0,2423	0,2506	0,1865	0,1872	0,1465	0,0813	0,0786	OTUR07	
D	0,1418	0,1686	0,179	0,171	0,1631	0,1513	0,1493	0,1146	0,108	0,0953	0,0877	0,0806	ATUR11	

Plates were coated with optimal dilution (well A-D) of capturing antibodies according to the final checkerboard dilution of each sero- type of FMDV antibodies (1/5000). Then, to check cross-reactions of FMDV OTUR07 with the other FMDV strains (ANepal and ATUR11), optimal dilution of FMDV OTUR07 was added to (well A-B). After that, optimal dilutions of FMDV A TUR11 and FMDV ANepal were added to wells C and D, respectively. Similar to the OTUR07 cross reaction study, the same steps were performed to detect cross-reactions of FMDV ATUR11 and ANepal with other FMDV serotypes. 11-12 wells were left as background.

Ethical statement: Ethics committee approval for the immunisation of guinea pigs used in the research was given by the local ethics committee of the Foot and Mouth Disease (SAP) Institute, Turkish Ministry of Agriculture and Rural Affairs (decision no: 2015/10). Ethics committee approval for the immunisation of rabbits used in the research was given by the local ethics committee of Veterinary Control Central Research Institute, Turkish Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Decision no: 2015/09).

Acknowledgements: The author is grateful to Dr. Bern Haas for his kind support for the blocking procedure of ELISA and thanks to Serology Laboratory technicians; Yavuz Yıldırım and Yusuf Demir for their laboratory effort. Faruk Yıldız, for his technical help in the 146S test. This study was supported by Foot-and-Mouth Disease Institute, SAP, Ankara.

Conflict of Interest: There is no conflict of interest.

References

Anonymus. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08FMD.pdf (Accessed: 10.08.2019)

Ascoli AG and Aggeler B. (2018) Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *Biotechniques*. 65, 127- 136. doi: 10.2144/btn-2018-0065.

Bari FD, Parida S, Teklegiorgis T, Dekker A, Sangula A, Reeve R, Haydon DT, Paton DJ, Mahapatra M (2014) Genetic and antigenic characterization of serotype A FMD viruses from East Africa to select new vaccine strains. *Vaccine*. 32, 5794-5800.

Barteling SJ and Melen RH. (1974) A simple method for the quantification of 140S particles of foot and mouth disease virus. *Arch Ges Virusforsch* 45, 362-364

Brocchi E. (2012). New ELISAs for FMD Diagnosis, EUFMD Open Session, October 29-31-Jerez, Spain.

Cao Y, Zhou W, Xing X, Zang J, Fu Y, Li K, Sun P, Li P, Bai X, Ma X, Bao H, Li D, Chen Y, Lu Z, Liu Z. (2018) Indirect ELISA using a multi-epitope recombinant protein to detect antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O in pigs. *J Virol Methods*. 262, 26-31. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.09.008

Crowther JR. (2001). ELISA guidebook, second edition Humana Press, UK, p:79

Diaz-San Segundo F, Medina GN, Stenfeldt C, Arzt J, de Los Santos T. (2017) Foot-and-mouth disease vaccines. *Vet Microbiol*. 206, 102-112. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.12.018.

Ferris NP, Donaldson AJ. (1984) Serological response of guinea pigs to inactivated 146S antigens of FMDV after single or repeated inoculations. *Rev Sci Tech OIE*. 3, 563-574.

Fry EE, Stuart DI, Rowlands DJ. (2005) The structure of FMDV. *Current Topics Microbiol Immunol*. 288, 71-101. doi: 10.1007/3-540-27109-0_4.

Hamblin C, Barnett ITR, Hedger RS. (1986) A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus I. Development and method of ELISA. *J Immunol Methods*. 93, 11-121. doi: 10.1016/0022-1759(86)90441-2.

- Harlow E and Lane D. (1988) *Antibodies, A laboratory manual*. Second edition, CSHL Press, USA, p: 60
- Have P, Lei JC, Thiesen K. (1984) An enzyme linked immune absorbent assay for the primary diagnosis of FMD. Characterization and comparison with complement fixation. *Acta Vet Scand.* 25, 280-296.
- Jamal SM, Belsham, GJ. (2013) Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet Res.* 44, 116. doi: 10.1186/1297-9716-44-116.
- Ko YJ, Jeoung HY, Lee HS, Chang BS, Hong S-M, Heo E-J, Lee K-N, Joo H-D, Kim SM, Park J-H, Kweon C-H. (2009) A recombinant protein based ELISA for detecting antibodies to foot-and-mouth disease virus serotype *Asia J Virol Methods* 159, 112-118. doi: DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.03.011
- Lavoria MÁ, Di-Giacomo S, Bucofusco D, Franco-Mahecha OL, Perez-Filgueira DM, Capozzo AV. (2012) Avidity and subtyping of specific antibodies applied to the indirect assessment of heterologous protection against Foot-and-Mouth Disease Virus in cattle. *Vaccine.* 30(48), 6845-50. doi:110.1186/1297-9716-44-116.
- Leenaars M and Hendriksen CF. (2005) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: Evaluation and recommendations. *ILAR Journal.* 46, 269-79. doi: 10.1093/ilar.
- Leenaars PPA, Hendriksen CFM, Leeuw WA, Carat F, Delehaut P, Fischer F, Halder M, Hanly WC, Hartinger J, Hau J, Lindblad EB, Nicklas B, Outschoorn M, Stewart-Tall DE. (1999) The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. *ATLA.* 27, 79-102. doi: 10.1177/ATLA.1999.
- Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. (2005) Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguish characteristics, applications, and information resources. *ILAR Journal.* 46, 258-268. doi: https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258
- Low D, O'Leary R, Pujar NS. (2006) Future of antibody purification. *J Chrom* 848, 48-63.
- Parida S. (2009) Vaccination against FMDV strategies and effectiveness. *Expert Rev Vaccines.* 8(3), 347-365. doi:10.1586/14760584.8.3.347.
- Ran X, Yang Z, Bai M, Zhang Y, Wen X, Guo H, Sun Ş. (2019) Development and validation of a competitive ELISA based on bacterium-original virus-like particles of serotype O foot-and-mouth disease virus for detecting serum antibodies. *Appl Microbiol Biotech.* 103, 3015-3024. doi:10.1007/s00253-019-09680-8.
- Russell and Burch's, 3Rs concept (Refine-Reduce-Replace, Russell W. (1959). *The principles of humane experimental technique*. London.
- Sala JM, Trotta MV, Mansilla FC, Filgueira MP, Gaston S, Capozzo A. (2018) Alternatives for the serological assessment of foot-and-mouth disease vaccine immunity in buffaloes (*Bubalus bubalis*) *J App Anim Res.* 46, 451-458. https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1335641
- Salem R, El-Kholy A, Omar AO, Abu-el Naga EI, Osman G. (2019) Construction, expression and evolution of recombinant VP2 protein for serotype independent detection of FMDV seropositive animals in *Egypt.* *Sci Report.* 9, 10135. doi: 10.1038/s41598-019-46596-9
- Sorensen KJ, Madsen KG, Madsen ES, Salt JS, Nqindi J, Mackay DKJ. (1998) Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non- structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch Virol.* 143, 1461-1476. doi: 10.1007/s007050050390
- Voskuil JLA. (2014) Commercial antibodies and their validation. *F1000 Research* 3, 232. doi: https://doi.org/10.12688/f1000research.4966.2
- Yang M, Xu W, Bitner H, Jacquelyn H, Vosloo W, Goolia M, Lusansky D, Nfon C. (2017) Generation of MAbs to foot-and-mouth disease virus serotype A and application in a competitive ELISA for serodiagnosis. *Virology.* 195(13), 195.
- Zumdahl SS and De Coste DJ. (2009). *Introduction Chemistry*. Ninth edition Cengage Learning, USA, p: 34



Pathogen isolation and antibiogram analysis in dairy cows with clinical mastitis in Adana region, Turkey

Serdal Kurt^{1*}, Funda Eşki²

¹ Kahramanmaraş İstiklal University, Elbistan Vocational School, Department of Veterinary, Kahramanmaraş, Turkey
² Cukurova University, Faculty of Ceyhan Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Adana, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 31.03.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 20.05.2021

Abstract: The goal of this study was to investigate pathogen types found in milk samples from cows with clinical mastitis, as well as the sensitivity of isolated bacteria to different antibiotics. The study was carried out on 103 milk samples collected from dairy cows with clinical mastitis. Microbiological isolation and identification were performed to identify gram negative and gram positive bacteria, *Mycoplasma bovis* and fungi. Then, bacteria isolated from infected milks were subjected to antibiogram, using 27 antimicrobials agents. As a result, a total of 146 isolates were obtained from 103 milk samples. The predominant pathogen isolates recovered were fungi (21.9%), *Escherichia coli* (19.9%) and *Staphylococcus aureus* (13.7%), followed by *Mycoplasma bovis* (8.2%) and *Streptococcus uberis* (6.8%). The mixed predominant pathogen was fungi, (75%) the majority of which mixed with gram positive bacteria. Ampicillin, Imipenem, Chloramphenicol and Streptomycin were the least effective antimicrobial agents, while the most effective agents were Florfenicol, followed by Amikacin and Kanamycin / Cefalexin. In conclusion, the types of microorganisms that cause mastitis and the antibiogram results of the bacteria isolated varied. Above all, fungal mastitis is a severe problem that should always be considered prior to starting antibiotic treatment.

Keywords: Antibiogram, clinical mastitis, cow, pathogen isolation

Türkiye, Adana bölgesindeki klinik mastitisli sütçü ineklerde patojen izolasyonu ve antibiyogram

Özet: Bu çalışmanın amacı, klinik mastitisli ineklerden alınan süt örneklerinde bulunan patojen türlerini ve izole edilen bakterilerin farklı antibiyotiklere duyarlılığını araştırmaktır. Çalışma klinik mastitisli sütçü ineklerden toplanan 103 süt numunesi üzerinde gerçekleştirildi. Gram negatif ve gram pozitif bakterileri, *Mycoplasma bovis* ve mantarları belirlemek için mikrobiyolojik izolasyon ve tanımlama yapıldı. Ardından, enfekte sütlerden izole edilen bakteriler, 27 antimikrobiyal ajan kullanılarak antibiyograma tabi tutuldu. Çalışma sonunda, 103 süt örneğinden toplam 146 izolat elde edildi. Elde edilen dominant patojen izolatları mantarlar (%21.9), *Escherichia coli* (%19.9) ve *Staphylococcus aureus* (%13.7), ardından *Mycoplasma bovis* (%8.2) ve *Streptococcus uberis* (%6.8) idi. Miks seyreden dominant patojen mantarları ve onların çoğu gram pozitif bakterilerle (%75) miks seyretti. En etkili ajanlar sırasıyla Florfenicol, Amikacin ve Kanamycin / Cefalexin iken en az etkili antibiyotikler Ampisilin, İmipenem, Chloramphenicol ve Streptomycin oldu. Sonuç olarak, mastitise neden olan mikroorganizma türleri ve izole edilen bakterilerin antibiyogram sonuçları farklılık göstermiştir. En önemlisi, mantar kaynaklı mastitis antibiyotik tedavisine başlamadan önce her zaman dikkate alınması gereken ciddi bir sorundur.

Anahtar kelimeler: Antibiyogram, inek, klinik mastitis, patojen izolasyonu

Introduction

Mastitis, which is the inflammation of the mammary gland against infectious and non-infectious factors (Bradley 2002), is known as a multifactorial problem of dairy cows that affects milk quality and quantity (Guimarães et al. 2017; He et al. 2020). Moreover, mastitis is the most common and the most costly production disease in the dairy herds (Abebe et al. 2016; Dalanezi et al. 2020) and it is an account for 38% of total economic losses caused by production diseases (Bradley 2002). Economic

losses caused by mastitis are related to the decrease in milk production, treatment and labour cost, milk disposal, decrease in the sale price of milk and the culling of animals (Demir et al. 2012; Guimarães et al. 2017; Ayvazoğlu and Eşki 2019). As a result of all these, mastitis causes an about the annual loss of \$159 per cow (Dalanezi et al. 2020). Mastitis occurs in clinical and subclinical forms and their average incidence was reported as 14.2% and 30%, respectively (Sundrum 2015). Furthermore, it has a serious zoonotic risk due to the presence of bacteria

and their toxins in milk (Abebe et al. 2016). As understood, mastitis is a global problem that must be tackled effectively due to its high incidence and prevalence (Sundrum 2015; Guimarães et al. 2017)

Mastitis has various etiologies (Bradley 2002; Dalanezi et al. 2020) and is most commonly caused by bacteria (Dalanezi et al. 2020). Epidemiologically, its the etiology has been categorized as environmental (Coliform) and contagious pathogens (Smith and Hogan 1993; Abebe et al. 2016). The major reservoir of contagious mastitis pathogens is cows, they are spread among animals (Fox and Gay 1993), and tend to cause chronic subclinical infections after exacerbation of clinical events (Abebe et al. 2016). Fox and Gay (1993) reported that main contagious mastitis agents suitable for this definition include *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*), *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*) and *Mycoplasma* spp. The main reservoir of coliform mastitis agents is the environment (Abebe et al. 2016). Approximately 90% of mastitis caused by them are clinical form. The major environmental pathogens are *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella* spp., *Streptococcus uberis* (*S. uberis*), *S. dysgalactiae* (included in both environmental and contagious mastitis agent), *Pseudomonas*, *Serratia* and *Proteus* (Smith and Hogan 1993). On the other hand, it is known that viruses, fungi and algae are among the important infectious agents that cause mastitis (Dalanezi et al. 2020), and fungal mastitis (mycotic mastitis) have become an increasing problem in recent years (Jasm and Yassein 2020). The commonly encountered causes of mycotic mastitis are *Candida* spp., *Trichosporon* spp., *Cryptococcus* spp., *Saccharomyces* spp., *Aspergillus* spp. (Dubie et al. 2015). Because use of antibiotics may also stimulate the multiplication of fungi, increases in fungal mastitis cases may be associated with antibiotic treatment (Wawron et al. 2010), so misdiagnosed fungal mastitis can be more exacerbated. Considering the differences in pathogen types, it is understood that the fight against mastitis is a difficult and complex situation (Taponen et al. 2017; Rahman et al. 2018). Moreover, the antimicrobial resistance of bacterial agents makes the fight against mastitis more critical (Pitkala et al. 2004; Rajala-Schultz et al. 2004; Tenhagen et al. 2006; Etifu and Tilahun 2019). Consequently, agent isolation and antibiogram test have become indispensable for a successful treatment and struggle.

Antibiotic treatments were reported to be often unsuccessful in mastitis cases in the Adana

region. On this situation, we hypothesized that fungal mastitis or antibiotic resistance would be common. This study was planned considering that it would be of economic importance. The aim of the present study was to investigate the pathogen types in milk samples of cows with clinical mastitis and the sensitivity of the isolated bacteria to various antibacterial drugs, in Adana region, Turkey.

Materials and Methods

Animal and management

This study was approved by the Local Ethics Committee of Ceyhan Veterinary Faculty, Cukurova University, Adana, Turkey (approval number 8/1 and 23.09.2020). The presented study was carried out on 103 milk samples collected from dairy cows with clinical mastitis in around 40 medium-scale commercial farms, Adana region, Turkey. The dairy cows had a similar lactation period, milk yield, age, parity, milking system and body condition score, and they were managed in free-stall barns under the same conditions, had free access to water. And cows did not receive any treatment before the study.

Udder examination and milk sample collection

Palpation and inspection methods were performed to examine typical signs of clinical mastitis by a veterinarian. The examination included abnormal milk, quarter asymmetry, blindness and inflammation such as redness, hotness, swelling and painful sensation. Milk samples (20- 25 ml) were collected from individual quarters with clinical mastitis to sterile falcon tubes under asepsis and antisepsis conditions. Briefly, milk sampling procedure was performed according to Laboratory Handbook on Bovine Mastitis of the National Mastitis Council (Hogan et al. 1999). After the milk samples were collected, they were immediately transported to the laboratory under the cold chain (4°C).

California mastitis test (CMT)

California mastitis test (CMT) was performed for confirmation of the examination applied by inspection and palpation. The test process and the interpretation of CMT results were made according to the Baştan et al. (2008)'s instructions.

Microbiological examination

Microbiological identification and isolation were performed according to National Mastitis Council's instructions (Hogan et al. 1999) to identify gram-negative (*Sphingomonas paucimobilis* (*S. paucimobilis*), *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*

aerogenes, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* (*p. aeruginosa*), *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*), gram-positive bacteria (*S. aureus*, *Staphylococcus simulans* (*S. simulans*), *Dermacoccus nishinomiyaensis* (*D. nishinomiyaensis*), *Staphylococcus chromogenes* (*S. chromogenes*), *Micrococcus luteus* (*M. luteus*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *S. agalactiae*, *Staphylococcus vitulinus* (*S. vitulinus*), *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus cecorum* (*E. cecorum*), *Actinomyces pyogenes*, *Kocuria rosea* (*K. rosea*), *Kytococcus sedentarius* (*K. sedentarius*) and *Bacillus cereus*), *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) and fungi. The procedures performed are summarized below as bacterioscopy and culture and biochemical identification headings.

Bacterioscopy

The milk samples collected from infected quarters were centrifuged and preparations were prepared from the sedimentation. Then, they were stained with gram staining methods for bacterioscopy examination.

Culture and Biochemical Identification

The milk samples were individually inoculated into blood agar (Oxoid, CM0055), MacConkey agar (Oxoid, CM0007) and Sabouraud Dextrose agar (Merck, 105438) using a quadrant streaking method, and they were incubated at 37°C for 24- 48 h. While blood agar and MacConkey agar were used for bacteriological isolation, Sabouraud Dextrose agar was used for fungal isolation. Morphologic characteristics of isolated microorganisms were observed on these primary cultures. And Gram staining was applied to define the gram reaction and shape of the cultures. Then, further biochemical tests, catalase, coagulase and oxidase tests were performed for more specific identification. Catalase test (Hydrogen peroxide solution, Catalog number: 88597, Millipore, Darmstadt, Germany) was performed using 3% Hydrogen peroxide (H₂O₂) and was used to identify catalase negative and catalase positive microorganism. Coagulase test (Coagulase Plasma Lyophilized. Rabbit plasma w / EDTA, Catalog number: R21052, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) was applied to differentiate *Staphylococcus* species. And oxidase test (BACTIDENT™ Rapid Testing Reagents, Oxidase; Catalog number: 1.00181.0002, Merck, Darmstadt, Germany) was used to differentiate microorganisms such as Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Neisseria*, *Alcaligenes* from others.

PCR method for *Mycoplasma bovis* identification

M. bovis from the milk samples was identified using a method, Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR), based on DNA extraction. Commercial Standard Real-Time PCR Detection Kit for *M. bovis* (Primer Design- GENESIG) was used to determine *M. bovis* in DNA samples by Real Time PCR method. The protocol was implemented according to the company's instructions.

Antibiogram

Bacteria isolated from infected milks were subjected to in vitro antibiotic sensitivity testing, using 27 antimicrobials agents by disc diffusion method (Bauer 1966). All antimicrobials used were Ampicillin, Nitrofrontain, Imipenem, Gentamycin, Gamithromycin, Cefquinome, Penicillin, Kanamycin, Amoxicillin / Clavulanic acid, Enrofloxacin, Neomycin / Bacitracin/ Tetracycline, Chloramphenicol, Kanamycin / Cefalexin, Sulfamethoxazole / Trimethoprim, Ceftriaxone, Cefotaxime, Amoxicillin, Amikacin, Florfenicol, Streptomycin, Enrofloxacin, Vancomycin, Tetrasiklin, Cefapirin, Rifampin, Azitromycin and Polymyxin B. Inoculum was prepared from primary culture. Petri dishes (Lamtek) were inoculated with the help of a sterile swab. Finally, the antimicrobial discs (Oxoid, Mastdiscs) were placed into petri dishes under sterile conditions and were incubated at 37°C for 24 hours. The antimicrobial sensitivity of bacteria was examined on the basis of zone diameter. The results were interpreted according to the manufacturer's standard chart and recorded as sensitive or resistant. *Mycoplasma* was not included in antibiogram tests.

Results

A total of 146 microorganisms isolates were obtained from 103 milk samples collected from 103 cows with clinical mastitis. Out of 103 samples, 72 samples (69.9%) yielded pure cultures of which 12 were *M. bovis*, 8 were fungi, 28 were gram negative and 24 were gram positive organisms, and the remaining 31 (30.1%) yielded mixed cultures. Of the 146 isolates, 12 (8.2%) were *M. bovis*, 32 (21.9%) were fungi, 41 (28.0%) were gram negative and remaining 61 (41.7%) were gram positive. The predominant pathogen isolates recovered were fungi, *E. coli* and *S. aureus* followed by *M. bovis* and *S. uberis*. However, other microorganisms were minimally detected. Mixed infections caused by two or more microorganisms were detected in milk culture. The mixed predominant pathogen was fungi, (75%) the majority of which mixed with gram positive bacteria. The results of isolation are detailed in Table 1.

Table 1. Frequency of isolation and microorganism species isolated from milk samples with clinical mastitis.

Microorganism species	Gram (- / +)	No. of Isolates	% of 146 Isolates	No. of Mix
<i>M. bovis</i>		12	8.2	0
Fungi		32	21.9	24
<i>E. coli</i>	-	29	19.9	7
<i>S. paucimobilis</i>	-	4	2.7	2
<i>Klebsiella</i> spp.	-	4	2.7	2
<i>P. aeruginosa</i>	-	2	1.4	0
Other gram (-) bacteria	-	2	1.4	2
<i>S. aureus</i>	+	20	13.7	9
<i>S. simulans</i>	+	5	3.4	4
<i>S. chromogenes</i>	+	3	2	0
<i>S. uberis</i>	+	10	6.8	4
<i>M. luteus</i>	+	1	0.7	1
<i>B. subtilis</i>	+	5	3.4	5
<i>S. epidermidis</i>	+	3	2	2
<i>S. agalactiae</i>	+	1	0.7	1
<i>E. cecorum</i>	+	1	0.7	1
<i>S. vitulinus</i>	+	1	0.7	0
<i>K. rosea</i>	+	1	0.7	1
<i>D. nishinomiyaensis</i>	+	3	2	3
<i>K. sedenterius</i>	+	1	0.7	1
Other gram (+) bacteria	+	6	4.1	5
Total		146	100	74

Table 2. Results of in vitro antibiogram examinations on bacteria isolated from 103 milk samples with clinical mastitis

Bacterial species (No. of isolates)	In vitro antibiogram sensitivity test results in percentage																			
	NTF	GA	CEA	P	K	AMC	ENR	NBT	CRO	KCFX	STX	CRO	CTX	AML	AK	FFC	S	ENR	V	T
<i>E. coli</i> (29)	3.4	31	10.3	0	0	0	0	0	0	37.9	6.8	3.4	6.8	6.8	10.3	20.6	0	3.4	0	3.4
<i>S. paucimobilis</i> (4)	0	50	25	0	0	0	25	25	0	0	0	0	25	0	0	50	0	25	0	25
<i>Klebsiella</i> spp (4)	0	25	75	25	25	25	0	25	0	25	0	0	0	0	75	50	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> (2)	0	0	50	0	0	0	50	0	0	0	50	0	0	0	50	0	0	50	0	0
Other gram (-) (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	100	50	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> (20)	0	25	25	5	0	0	5	0	0	30	5	0	0	5	40	40	0	20	5	5
<i>S. simulans</i> (5)	20	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	20	0	0	20	40	0	0	20	0
<i>S. chromogenes</i> (3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. uberis</i> (10)	0	20	20	0	10	20	20	30	0	60	0	0	0	10	80	50	0	0	0	0
<i>M. luteus</i> (1)	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0
<i>B. subtilis</i> (5)	0	80	40	20	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	20	40	0	20	0	40
<i>S. epidermidis</i> (3)	0	66.6	0	0	0	0	0	0	33.3	33.3	0	0	66.6	0	33.3	66.6	0	33.3	0	0
<i>S. vitulinus</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0
<i>K. rosea</i> (1)	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
<i>D. nishinomiyaensis</i> (3)	0	33.3	0	0	0	0	0	0	0	33.3	0	0	0	0	33.3	0	0	0	0	0
<i>K. sedenterius</i> (1)	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
Other gram (+) (6)	0	0	16.6	0	0	16.6	0	0	0	33.3	16.6	0	0	0	33.3	50	0	0	0	0
Total (102)	1.9	27.4	18.6	2.9	1.9	3.9	6.2	4.9	0.9	32.3	4.9	1.9	4.9	3.9	33.3	34.3	0.9	8.8	1.9	3.9

NTF: Nitrofronain, GA: Gamithromycin, CEA: Cefquinome, P: Penicillin, K: Kanamycin, AMC: Amoxicillin / Clavulanic acid, ENR: Enrofloxacin, NBT: Neomycin / Bacitracin / Tetracycline, CRO: Chloramphenicol, KCFX: Kanamycin / Cefalexin, STX: Sulfamethoxazole / Trimethoprim, CRO: Ceftriaxone, CTX: Cefotaxime, AML: Amoxicicilin, AK: Amikacin, FFC: Florfenicol, S: Streptomycin, ENR: Enrofloxacin, V: Vancomycin, T: Tetrasiklin

The antibiogram conducted on the bacteria isolated from infected milk samples showed different results, which may vary from agent to agent. Cefapirin, Rifampin, Azitromycin and Polymyxin B had no effect any bacterial isolate. Ampicillin (5%), Imipenem (5%), Gentamycin (10%) had an effect only on *S. aureus*. And considering all cases, Ampicillin, Imipenem, Chloramphenicol and Streptomycin were the least effective antimicrobial agents, while the most effective antibiotic was Florfenicol, followed by Amikacin and Kanamycin / Cefalexin. On the other hand, 48.2% of *E. coli*, 25% of *S. paucimobilis*, 20% of *S. aureus*, 40% of *S. simulans*, 100% of *S. chromogenes*, 10% of *S. uberis*, 33.3% of other gram (+) bacteria, 100% of *S. agalactiae* and 100% of *E. cecorum* showed resistance to all antimicrobial agents. The effective antibiogram results are given in Table 2.

Discussion and Conclusion

In the present study, firstly the types of microorganisms that cause clinical mastitis were determined. Then, the sensitivity of isolated bacterial pathogens to 27 different antibacterial agents was investigated. Among the microorganisms isolated in this study, fungi, *E. Coli* and *S. aureus* were determined as the major cause of mastitis, but the obtained result showed some differences compared to the previous report (Green et al. 2002; Baştan et al. 2008; Rahman et al. 2018).

It has been reported that fungi are usually agents in bovine mastitis and are commonly considered to be an environmental mastitis agent due to poor hygiene (Krukowski et al. 2001). There are different types of fungi that cause mycotic mastitis (Du et al. 2018). However, its most common cause was found the genus *Candida* (Zaragoza et al. 2011; Eldesouky et al. 2016; Du et al. 2018). They may be also associated with clinical mastitis (Jasm and Yassein 2020). In the present study, because the main aim was to investigate the importance of fungi in mastitis cases, no species distinction was performed. It has been reported that the prevalence of mycotic mastitis has considerably increased in recent years (Zhou et al. 2013) and the rates of fungi isolated from milk with mastitis differed significantly by country. And this rate was noted as 12.1% in Turkey (Jasm and Yassein 2020). However, it was found to be higher (31.06%) in our study. We considered that it may be due to Adana's subtropical climate (Krukowski and Saba 2003). Antibiotics are administered more frequently in

routine mastitis treatment and antifungal treatment is not given importance (Pachauri et al. 2013). However, the presence of fungi in mastitis cases reveals the importance of pathogen isolation for treatment and control. Moreover, the differences in bacterial species isolated and their antibiotic resistance make the situation even more critical. The results demonstrated that 48.27% of *E. coli* isolated developed resistance to all antimicrobial agents used in this study. And the most effective antimicrobial agent against *E. coli* was Kanamycin / Cefalexin (37.93%). Another study showed that *E. coli* has a sensitivity of 94.59% against Chloramphenicol in buffaloes (Charaya et al. 2014). Mohanty et al. (2013) reported that *E. coli* were the most sensitive toward Levofloxacin (96.66%) and Chloramphenicol (90%). Similarly, other studies showed differences in antimicrobial agents to which *E. coli* was sensitive (Tenhagen et al. 2006; Bhat et al. 2017; Taponen et al. 2017). It also is known that the treatment process of cases of *E. coli* is easier than cases of *S. aureus*, another major pathogen (Luoreng et al. 2018). And its rate and spread in the herd is closely related to management (Rainard et al. 2018). In a previous study, all staphylococcal species including *S. aureus* were determined at a rate of 20.4% (Twomey et al. 2000), which is similar to the ratio of our study. Antibiotic treatment is mostly ineffective for mastitis caused by *S. aureus* (Luoreng et al. 2018). In the present study, results of antibiogram test for *S. aureus* showed that Amikacin (40%) and Florfenicol (40%) to be the most effective of all antibiotics. Charaya et al. (2014) also reported that Amikacin (88.57%) the most effective antibiotic for *S. aureus* isolated in buffaloes. On the other hand, several studies declared that *S. aureus* is most sensitive to Enrofloxacin and Ciprofloxacin (Ismail 2017), Levofloxacin (88.23%) and Enrofloxacin (88.23%) (Mohanty et al. 2013), Gentamicin (100%) and Erythromycin (100%) (Tenhagen et al. 2006). It was also observed that there was a difference in the rates of isolated *S. aureus* in these studies. Other important pathogens isolated in the present study were *M. bovis* (8.2%) and *S. uberis* (6.8 %). Mastitis caused by mycoplasma is not as common as mastitis caused by other bacteria (Nicholas et al. 2016). However, it generally does not respond to antibiotic therapy and highly contagious (Fujimoto et al. 2020; Liu et al. 2020). It also has been reported that *mycoplasma* has no cell wall (Parker et al. 2018) and to be resistant to all major classes of antimicrobial drugs. Therefore, the control of *mycoplasma* mastitis with antibiotic treatment is usually unsuccessful (Nicholas et al. 2016). As understood, protection and

prevention come to the fore in the fight against this pathogen. For these reasons, we did not perform an antibiogram test against *M. bovis*.

It was declared that *S. uberis* is among the most important factors causing bovine mastitis (Käppeli et al. 2019), has an increasing prevalence worldwide and responsible for 14 to 26% of clinical mastitis (Phuektes et al. 2001). On the other hand, Käppeli et al. (2019) reported that clinical mastitis cases caused by *S. uberis* have decreased with preventive control studies. Antibiogram results of the study conducted by Phuektes et al. (2001) showed that all isolates of *S. uberis* sensitive towards Vancomycin and Cephalexin. Other studies revealed that the most effective antimicrobial agents against to *Streptococcus* species isolated were Chloramphenicol and Tetracycline (100%) (Kurjogi and Kaliwal 2011), Levofloxacin, Enrofloxacin and Ciprofloxacin (Mohanty et al. 2013) However, no similar results were observed by the current study, we found that *S. uberis* the most sensitive to (80%) Amikacin, followed by Kanamycin / Cefalexin (60%).

Antimicrobial agents effective against minor pathogens isolated in our study and their effectiveness rates showed different distributions and results. Furthermore, some antibiotics had a higher success rate on them compared to major pathogens. We interpreted this as that these bacteria develop less antibiotic resistance since they are not the common cause of mastitis. We also thought that the differences in isolated microorganism and antibiotic resistance vary according to the regions where the study was conducted, management conditions, hygiene and the antibiotics preferred in previous treatments.

In conclusion, the types of microorganisms that cause mastitis and the antibiogram results of the bacteria isolated varied, and the predominant pathogens were fungi, *E. coli* and *S. aureus*. Fungal mastitis is serious problem, should always be considered before routine antibiotic therapy and emphasis should be given on antifungal therapy. Considering all bacterial cases, the most effective antibiotic was Florfenicol, followed by Amikacin and Kanamycin / Cefalexin, respectively. However, a one-sided treatment cannot be successful in mastitis. Therefore, determine the pathogens that cause mastitis and the selection of the appropriate treatment are very important in the prevention, control and treatment process.

Ethic statement: Ethical approval This article has not been published previously and is not under

consideration for publication elsewhere. The publication of this article is approved by all authors and explicitly by the responsible authorities where the work was carried out. This study was approved by the Local Ethics Committee of Ceyhan Veterinary Faculty, Cukurova University, Adana, Turkey (approval number 8/1 and 23.09.2020).

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abebe R, Hatiya H, Abera M, Megersa B, Asmare K. (2016) Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Vet Res*, 12, 1-11.
- Ayvazoğlu Demir P, Eşki F. (2019) Estimate by Quantitative Methods of the Effect on Some Milk Yield Traits with CMT Score of Subclinic Mastitis in Cows: Pilot Study. *Van Vet J*, 30, 177-182.
- Baştan A, Kaçar C, Acar DB, Şahin M, Cengiz M. (2008) Investigation of the incidence and diagnosis of subclinical mastitis in early lactation period cows. *Turkish J Vet Anim Sci*, 32, 119-121.
- Bauer AW. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin*, 45, 149-158.
- Bhat AM, Soodan JS, Singh R, Dhobi IA, Hussain T, Dar MY, Mir M. (2017) Incidence of bovine clinical mastitis in Jammu region and antibiogram of isolated pathogens. *Vet World*, 10, 984-989.
- Bradley AJ. (2002) Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J*, 164, 116-128.
- Charaya G, Sharma A, Kumar A, Singh M, Goel P. (2014) Pathogens isolated from clinical mastitis in Murrah buffaloes and their antibiogram. *Vet World*, 7, 980-985.
- Dalanezi FM, Joaquim SF, Guimarães FF, Guerra ST, Lopes BC, Schmidt EMS, Cerri RLA, Langoni H. (2020) Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. *J Dairy Sci*, 103, 3648-3655.
- Demir P, Derbentli Ö, Sakarya E. (2012) Measurement the Efficiency of Dairies in the Kars Province with Data Envelopment Analysis. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18, 169-17622.
- Du J, Wang X, Luo H, Wang Y, Liu X, Zhou X. (2018) Epidemiological investigation of non-albicans *Candida* species recovered from mycotic mastitis of cows in Yinchuan, Ningxia of China. *BMC Vet Res*, 14, 1-9.
- Dubie T, Sisay T, Gebru M, Muktar Y. (2015) An insight review on the role of fungi in mastitis of dairy animals and its economical importance. *J Vet Sci Photon*, 116, 440-445.
- Eldesouky I, Mohamed N, Khalaf D, Salama A, Elsify A, Ombarak R, Elballal S, Effat M, Alshabrawy M. (2016) *Candida* mastitis in dairy cattle with molecular detection of *Candida albicans*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 22, 461-464.
- Etifu M, Tilahun M. (2019) Prevalence of bovine mastitis, risk factors, isolation and anti-bio gram of major pathogens in Mid Rift valley, Ethiopia. *IJLP*, 10, 14-23.
- Fox LK, Gay JM. (1993) Contagious mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 9, 475-487.
- Fujimoto Y, Ito H, Higuchi H, Ohno H, Makita K. (2020) A case-control study of herd-and cow-level risk factors associated with an outbreak of *Mycoplasma mastitis* in Nemuro, Japan. *Prev Vet Med*, 177, 1-9.

- Green MJ, Green LE, Medley GF, Schukken YH, Bradley AJ. (2002) Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. *J Dairy Sci*, 85, 2589-2599.
- Guimarães JLB, Brito MAVP, Lange CC, Silva MR, Ribeiro JB, Mendonça LC, Mendonça JFM, Souza GN. (2017) Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. *Prev Vet Med*, 142, 46-50.
- He W, Ma S, Lei L, He J, Li X, Tao J, Wang X, Song S, Wang Y, Wang Y, Shen J, Cai C, Wu C. (2020) Prevalence, etiology, and economic impact of clinical mastitis on large dairy farms in China. *Vet Microbiol*, 242, 1-7.
- Hogan JS, Gonzalez RN, Harmon RJ, Nickerson SC, Oliver SP, Pankey JW, Smith KL, Hogan J, Armas-Portela R, Harmon R, Nickerson SC, Oliver S, Pankey J. (1999) Laboratory handbook on bovine mastitis. *National Mastitis Council*, Madison, Wisconsin.
- Ismail ZB. (2017) Molecular characteristics, antibiogram and prevalence of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* (MDRSA) isolated from milk obtained from culled dairy cows and from cows with acute clinical mastitis. *Asian Pac J Trop Biomed*, 7, 694-697.
- Jasm Mohammed S, Yassein SN. (2020) Characterization of some virulence factors of candida albicans isolated from subclinical bovine mastitis. *Plant Arch*, 20, 238-242.
- Käppeli N, Morach M, Zurfluh K, Corti S, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. (2019) Sequence types and antimicrobial resistance profiles of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. *Front Vet Sci*, 6, 1-7.
- Krukowski H, Saba L. (2003) Bovine mycotic mastitis. *Folia Vet*, 47, 3-7.
- Krukowski H, Tietze M, Majewski T, Rózański P. (2001) Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. *Mycopathologia*, 150, 5-7.
- Kurjogi MM, Kaliwal BB. (2011) Prevalence and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from bovine mastitis. *Adv Appl Sci Res*, 2, 229-235.
- Liu Y, Xu S, Li M, Zhou, M, Huo W, Gao J, Liu G, Kastelic JP, Han B. (2020) Molecular characteristics and antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* associated with mastitis on dairy farms in China. *Prev Vet Med*, 182, 1-9.
- Luoreng ZM, Wan X.P, Mei CG, Zan LS. (2018) Comparison of microRNA profiles between bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Int J Biol Sci*, 14, 87-99.
- Mohanty NN, Das P, Pany SS, Sarangi LN, Ranabijuli S, Panda HK. (2013) Isolation and antibiogram of *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Escherichia coli* isolates from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *Vet World*, 6, 739-743.
- Nicholas RA, Fox LK, Lysnyansky I. (2016) *Mycoplasma mastitis* in cattle: To cull or not to cull. *Vet J*, 216, 142-147.
- Pachauri S, Varshney P, Dash SK, Gupta MK. (2013) Involvement of fungal species in bovine mastitis in and around Mathura, India. *Vet World*, 6, 393-395.
- Parker AM, Sheehy PA, Hazelton MS, Bosward KL, House JK. (2018) A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *J Vet Intern Med*, 32, 1241-1252.
- Phuektes P, Mansell PD, Dyson RS, Hooper ND, Dick S, Browning GF. (2001) Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. *J Clin Microbiol*, 39, 1460-1466.
- Pitkala A, Haveri M, Pyörala S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. (2004) Bovine mastitis in Finland 2001—prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci*, 87, 2433-2441.
- Rahman MM, Fakhruzzaman M, Rahman M, Khaton R, Iqbal SM, Sharmin S, Islam MH. (2018) Isolation, identification and antibiogram study of *Escherichia coli* from the cases of mastitis. *BLJ*, 1, 1-6.
- Rainard P, Foucras G, Fitzgerald J.R, Watts JL, Koop G, Middleton JR. (2018) Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transbound Emerg Dis*, 65, 149-165.
- Rajala-Schultz PJ, Smith KL, Hogan JS, Love BC. (2004) Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet Microbiol*, 102, 33-42.
- Smith KL, Hogan JS. (1993) Environmental mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 9, 489-498.
- Sundrum A. (2015) Metabolic disorders in the transition period indicate that the dairy cows' ability to adapt is overstressed. *Animals*, 5, 978-1020.
- Taponen S, Liski E, Heikkilä AM, Pyörälä S. (2017) Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. *J Dairy Sci*, 100, 493-503.
- Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. (2006) Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci*, 89, 2542-2551.
- Twomey DP, Wheelock AI, Flynn J, Meaney WJ, Hill C, Ross RP. (2000) Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lactacin. *J Dairy Sci*, 83, 1981-1988.
- Wawron W, Bochniarz M, Piech T. (2010) Yeast mastitis in dairy cows in the middle-eastern part of Poland. *Bull Vet Inst Pulawy*, 5, 201-204.
- Zaragoza CS, Olivares RAC, Watty AD, Moctezuma AL, Tanaca LV. (2011) Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Rev Iberoam Micol*, 28, 79-82.
- Zhou Y, Ren Y, Fan C, Shao H, Zhang Z, Mao W, Wei C, Ni H, Zhu Z, Hou X, Piao F, Cui Y. (2013) Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. *Trop Anim Health Prod*, 45, 1709-1714.



First molecular detection of Canine Hemoplasmas in Sivas province in central part of Turkey

Ufuk Erol^{1*}, Kürşat Altay², Ahmet Duran Ataş³, Ömer Faruk Şahin⁴, Osman Furkan Urhan⁵

^{1,2,4} Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Sivas Cumhuriyet, Sivas, Turkey.

³ Department of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Sivas Cumhuriyet, Sivas, Turkey.

⁵ Et ve Süt Kurumu, Sivas Et Kombinasi Müdürlüğü, Sivas, Turkey.

Geliş Tarihi / Received: 25.03.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 07.06.2021

Abstract: Canine hemoplasmas are vector-borne bacterial pathogens having worldwide distribution. There are two hemoplasmas species that cause disease in dogs. These are *Mycoplasma haemocanis* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*. The aim of this study was to evaluate the prevalence of canine hemoplasmas among apparently healthy 194 owned-dogs in Sivas Province using species-specific polymerase chain reaction (PCR). According to our results, the overall prevalence of canine hemoplasmas was 14.94% (29/194). The molecular prevalence of *M. haemocanis* and *Ca. M. haematoparvum* was detected as 8.24% (16/194) and 10.82% (21/194) respectively while the prevalence of co-infections was 4.12% (8/194). In this study, *Ca. M. haematoparvum* which can infect humans was found more prevalent than *M. haemocanis*. To the best of our knowledge, it is the first molecular study on the determination of canine hemoplasmas in Sivas province in Turkey.

Keywords: Canine hemoplasmas, Dog, PCR, Sivas, Turkey.

Sivas ilinde Canine Hemoplasma'nin ilk moleküler tespiti

Özet: Canine hemoplasmas türleri vektör kaynaklı önemli bakteriyel patojenlerdendir. Etkenler dünyanın farklı bölgelerinde evcil köpeklerde tespit edilmiştir. Köpeklerde hastalığa neden olan iki önemli hemoplasma türü vardır. Bunlar sırasıyla *Mycoplasma haemocanis* ve *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*'dur. Bu çalışmanın amacı Sivas ilinde 194 evcil köpekte canine hemoplasmas etkenlerinin yaygınlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile araştırılmasıdır. Bu çalışmada köpeklerin %14,94 (29/194)'ünde en az bir canine hemoplasmas türü ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. Köpeklerin %8,24 (16/194)'ünde *M. haemocanis*, %10,82 (21/194)'ünde ise *Ca. M. haematoparvum* tespit edilmiştir. Köpeklerin %4,12 (8/194)'ünde ise miks enfeksiyon görülmüştür. Çalışmada köpeklerde *Ca. M. haematoparvum*'un *M. haemocanis*'e göre daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile bildiğimiz kadarıyla Sivas ilinde ilk kez köpeklerde moleküler yöntemlerle canine hemoplasmas türlerinin yaygınlığı araştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: Canine hemoplasmas, Köpek, PCR, Sivas, Türkiye.

Introduction

Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas) are tiny and pleomorphic bacterial agents that are cell-wall-deficient, obligate, and gram-negative. These pathogens invade red blood cells (RBCs) of different vertebrates, including dogs (Messick 2004; Chalker 2005; Sykes et al. 2005). Two hemoplasmas species are determined as canine-specific. These species are *Mycoplasma haemocanis* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* (Messick 2004; Sykes et al. 2005). Although these species might affect different organs and tissues, infections are mostly asymptomatic in healthy dogs (Messick 2004; Chalker 2005). In some cases, progressive

anemia can be seen in acute infections in immune-compromised or splenectomized dogs (Messick 2004; Sykes et al. 2005). Canine hemoplasmas rarely cause death (Messick 2004; Chalker 2005).

Transmission of canine hemoplasmas species is still not well defined, however *Rhipicephalus sanguineus*, brown dog tick, is thought to be a possible vector species of these species (Messick 2004; Baker and Tasker 2016; Aktas and Ozubek 2017). *M. haemocanis* and *Ca. M. haematoparvum* may also be transmitted mechanically via blood transfusions, fresh blood-contaminated fomites, and blood-sucking arthropods (Messick 2004; Willi et al. 2010; Baker and Tasker 2016).

Yazışma adresi / Correspondence: Ufuk Erol, Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Sivas Cumhuriyet, Sivas, Turkey E-mail: ufukerol@cumhuriyet.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0002-6766-1335 • ²0000-0002-5288-1239 • ³0000-0002-6274-414X • ⁴0000-0002-3230-504X • ⁵0000-0002-2834-3051

Microscopic, serological, and molecular methods have been used for the diagnosis of canine hemoplasmas infection so far (Messick 2004; Baker and Tasker 2016; Aktas and Ozubek 2018; Altay et al. 2020a). The microscopic techniques are successfully used for the diagnosis of clinical canine hemoplasmas infection (Baker and Tasker 2016) however, these techniques are not usable for the determination of chronic infections and may also cause false-positive results due to stain precipitation, basophilic stippling, or Howell-Jolly bodies (Kemming et al. 2004; Baker and Tasker 2016). Serological techniques and microscopic techniques are not fit to determine the pathogen species that cause canine hemoplasmas infection (Baker and Tasker 2016). Molecular identification techniques have been more preferred for the diagnosis of canine hemoplasmas compared to the microscopic and serological techniques. These methods; i) can determine the hemoplasmas species that caused infections in dogs ii) may find a small amount of nucleic acid that belongs to pathogens iii) can detect carrier animals (Messick 2004; Willi et al. 2010; Baker and Tasker 2016; Aktas and Ozubek 2017; Altay et al. 2020a).

Canine hemoplasmas species have been identified in different countries (Wengi et al. 2008; Compton et al. 2012; Baker and Tasker 2016; Maggi and Krämer 2019; Altay et al. 2020a), and in different parts of Turkey (Guo et al. 2017; Aktas and Ozubek 2017; Aktas and Ozubek 2018). There is a paucity of information on canine hemoplasmas in Sivas province. Due to this, the present study aimed to determine the molecular prevalence of canine hemoplasmas in Sivas province.

Material and Methods

Study Area and Material

Sivas province is placed in the central part of Turkey. Sivas has an approximately 28,400 km² geographical area. The average annual temperature is 8.9°C, the average precipitation, and relative humidity are 432 mm and 65% in Sivas, respectively.

The study material was composed of 194 (95 female, 99 male) apparently healthy owned-dog in four different parts of Sivas (Sivas City Center, Kangal, Yıldızeli, Hafik). The age, gender, and location data of the dogs were recorded. The blood samples were taken into blood collection tubes containing Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). The blood samples were stored at -20°C until DNA extraction.

Total Genomic DNA isolation and Polymerase Chain Reaction (PCR)

Total genomic DNA was obtained from 200 µL blood samples using PureLink Genomic DNA kit (Cat. No.: K1820-02, Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions. The genomic DNA samples were stored at -20°C until use.

PCR assay using species-specific primers was performed for determination of the presence and distribution of canine *Mycoplasma* species (Torkan ve ark. 2014). Further information on primers was detailed in Table 1. PCR was performed in a final volume of 50 µL including DNase-RNase-free sterile water (Cat No.: 129114, Qiagen®, Germany), 10× PCR buffer (Thermo Scientific™, Lithuanian), 2.5 mM MgCl₂ (25 mM) (Thermo Scientific™, Lithuanian), 200 µM of each dNTP (Cat. No.: PCCSKU1019, Procomcure Biotech GmbH), 1.25 U of Taq DNA polymerase (Cat. No.: EP0402, Thermo Scientific™, Lithuanian), 2 µL (10 pmol/µL) of each of the primers, and 5 µL template DNA. The PCR cycling conditions were done as described by Altay et al. (2020a). DNase-RNase-free sterile water (Cat. No.: 129114, Qiagen®, Germany) was used as negative control, the genomic DNA of *M. haemocanis* isolate (accession number: MK015018, Altay et al. 2020a) and *Ca. M. haematoparvum* (accession number: MK026012, Altay et al. 2020a) were used as positive controls for each PCR assay. Ten microliters of PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gel stained (100V, 45 min) with ethidium bromide and then were visualized by UV transilluminator (Figure 1). DNA extraction and PCR assay were conducted in different rooms for prevention of cross-contamination.

Table 1. Primers using in the present study.

Species	Primers 5'→3'	Target Gene	Length of Product	Reference
<i>M. haemocanis</i>	Forward GAAACTAAGGCCATAAATGACGC	16S rRNA	309 bp	Torkan et al. 2014
	Reverse ACCTGTCACCTCGATAACCTCTAC			
<i>Ca. M. haematoparvum</i>	Forward ACGAAAGTCTGATGGAGCAATAC	16S rRNA	328 bp	Torkan et al. 2014
	Reverse TATCTACGCATTCCACCGCTAC			

Statistical evaluation: Statistical analyses among various parameters were performed using the chi-square test. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.

Results

All dog blood samples were screened for *M. haemocanis* and *Ca. M. haematoparvum* by PCR using the primers detailed in Table 1. The overall prevalence of hemoplasmas species was found to be 14.94% (29/194). The prevalence of *M. haemocanis* was detected as 8.24% (16/194), while the prevalence of *Ca. M. haematoparvum* was detected as 10.82% (21/194). Co-infections were found to be 4.12% (8/194) (Table 2).

The prevalence among female dogs was detected as 14.73% (14/95), while among the male dogs it was 15.15% (15/99). Canine hemoplasmas were found to be 8.95% (6/67) between 0 and 2 years of age, 19.40% (13/67) between 3 and 4 years of age, and 16.66% (10/60) in dogs ≥ 5 years old (Table 2). The distribution of canine hemoplasmas in the sampling area was determined to be 18.84% (13/69) in Sivas city center, 13.33% (6/45) in Kangal, 11.11% (5/45) in Hafik, and 14.28% (5/35) in Yildizeli.

There were not statistically significant differences ($p < 0.05$) between the prevalence of hemoplasmas species, sampling area, gender, and age groups.

Table 2. Comparison of canine hemoplasmas among gender, sampling area, and age groups.

Canine hemoplasmas species	Gender		Sampling Area				Age groups		
	Male	Female	Sivas City Center	Hafik	Yildizeli	Kangal	0-2	3-4	≥ 5
<i>M. haemocanis</i>	3	5	6	-	-	2	4	2	2
<i>Ca. M. haematoparvum</i>	8	5	3	3	4	3	-	7	6
Co-infections	4	4	4	2	1	1	2	4	2
Total	15 (15.15%)	14 (14.73%)	13 (18.84%)	5 (11.11%)	5 (14.28%)	6 (13.33%)	6 (8.95%)	13 (19.40%)	10 (16.66%)
p-value	p>0.05		p>0.05				p>0.05		

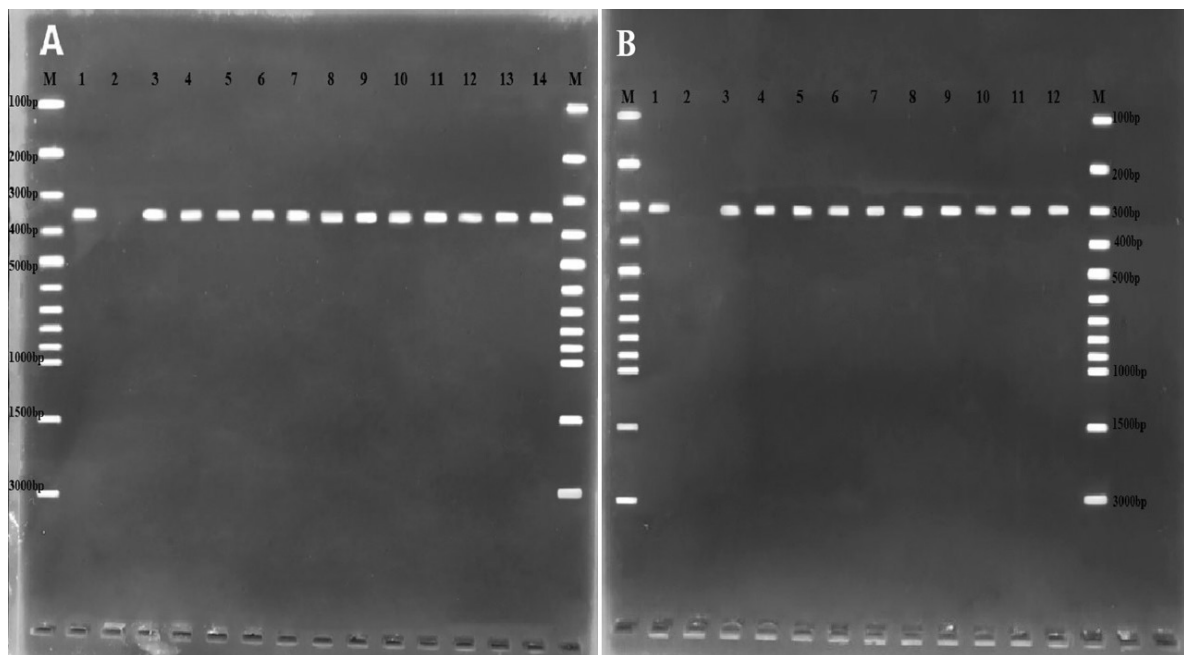


Figure 1. Agarose-gel electrophoresis of *Ca. M. haematoparvum* (A) and *M. haemocanis* (B) specific polymerase chain reaction. M. Marker, Lane A1. *Ca. M. haematoparvum* positive control DNA from dog, Lane A2. negative control distilled water, Lane A3-A14. *Ca. M. haematoparvum* positive dog blood samples, Lane B1. *M. haemocanis* positive control DNA dog, Lane B2. negative control distilled water, Lane B3-B12. *M. haemocanis* positive dog blood samples.

Discussion and Conclusions

Canine hemoplasmas are one of important tick-borne pathogens. Two hemoplasmas species, *M. haemocanis* and *Ca. M. haematoparvum*, are known to be the pathogens for domestic and wild canine species (Messick 2004; Sykes et al. 2004; André et al. 2011; Torkan et al. 2014; Baker and Tasker 2016). *M. haemocanis* was reported for the first time in 1928, while *Ca. M. haematoparvum* was identified in 2004 (Sykes et al. 2004). *M. haemocanis* and *Ca. M. haematoparvum* have a worldwide distribution (Wengi et al. 2008; Novacco et al. 2010; Compton et al. 2012; Baker and Tasker 2016; Maggi and Krämer 2019; Altay et al. 2020a), however there is little data available on the prevalence of these pathogens in Turkey (Guo et al. 2017; Aktas and Ozubek 2017; Aktas and Ozubek 2018). Sivas is the second-largest province and located in the central part of Turkey. There are found blood parasites such as *Theileria*, *Babesia*, *Anaplasma*, and *Dirofilaria immitis* in animal species like dogs, sheep, and cattle in different studies (Altay et al. 2017; Atas et al. 2018; Altay et al. 2020b). However, there is a lack of information molecular prevalence of canine hemoplasmas. Therefore, this study aimed to determine the prevalence of canine hemoplasmas in Sivas province using PCR.

There are different techniques to diagnose canine hemoplasmas species, but molecular identification techniques have been more preferred since they are faster and more specific than other identification techniques (Messick 2004; Willi et al. 2010; Torkan et al. 2014; Baker and Tasker 2016). *M. haemocanis* and *Ca. M. haematoparvum* have been detected in different geographical areas such as Turkey, Italy, Spain, Portugal, the USA, Sudan, and Kyrgyzstan using species-specific PCR (Inokuma et al. 2006; Novacco et al. 2010; Compton et al. 2012; Aquino et al. 2016; Aktas and Ozubek 2017; Guo et al. 2017; Ravagnan et al. 2017; Aktas and Ozubek 2018; Altay et al. 2020a). A few studies were carried out to determine the presence and distribution of canine hemoplasma infection in Turkey (Aktas and Ozubek 2017; Guo et al. 2017; Aktas and Ozubek 2018). These studies revealed that the prevalence of canine hemoplasmas was ranging from 15.3 to 38.3% in dog population in different parts of Turkey (Aktas and Ozubek 2017; Guo et al. 2017; Aktas and Ozubek 2018). In the present study, the overall prevalence was determined as 14.94% (29/194). Our result was similar to that of Aktas and Ozubek (2018) (15.3%), however the prevalence we found was lower than that in Konya %23.95% (Guo et al. 2017)

and in Diyarbakır 38.3% (Aktas and Ozubek 2017). Like other vector-borne diseases, the prevalence of canine hemoplasmas might change depending on climate conditions in sampling areas, presence and distribution of vector species, and dog origin (stray or owned) (Baker and Tasker 2016; Guo et al. 2017; Aktas and Ozubek 2018; Maggi and Krämer 2019). The present study was performed using owned-dogs while the studies that have higher prevalence of canine hemoplasmas in Konya (Guo et al. 2017) and in Diyarbakır (Aktas and Ozubek 2017) were conducted using stray dog samples. Stray dogs are frequently exposed to ectoparasites such as ticks and fleas. Therefore, vector-borne pathogens may be more prevalent in stray dogs compared to owned-dogs. For this reason, we speculate that the lower prevalence (14.94%) compared to the ones in Diyarbakır (38.3%) and Konya (23.95%) could be related to that this study was performed using owned-dog blood samples.

In the present study, there were no statistically significant differences between the prevalence of *M. haemocanis* and *Ca. M. haematoparvum*. The prevalence of *M. haemocanis* was detected as 8.24% (16/194), while the prevalence of *Ca. M. haematoparvum* was found to be 10.82% (21/194). In the previous studies conducted in Turkey, *M. haemocanis* was found more prevalent than *Ca. M. haematoparvum* (Aktas and Ozubek 2017; Aktas and Ozubek 2018), however, in this study, *Ca. M. haematoparvum* was found more prevalent than *M. haemocanis*. These findings were similar to the studies in France (Kenny et al. 2004), Sudan (Inokuma et al. 2006), and the USA (Compton et al. 2012). Furthermore, *Ca. M. haematoparvum* can cause human infections (Maggi et al. 2013). Therefore, veterinarians and people who have intimate contact with dogs should be careful about this pathogen to protect their health.

According to our PCR results, the prevalence of canine hemoplasmas was found to be 15.15% (15/99) in the male dogs and 14.73% (14/95) in the female dogs. There was no significant association of canine hemoplasma infection with dog gender. This result was similar to the studies performed in different countries like France (Kenny et al. 2004), Italy (Ravagnan et al. 2017), and Turkey (Aktas and Ozubek 2017; Aktas and Ozubek 2018). In the present study, we found that the prevalence of canine hemoplasmas in the male dogs was slightly higher than in the female dogs. This finding may be related to that male dogs tend to have more aggressive contact with other dogs than female dogs, due to

these pathogens also can be transmitted with fresh blood (Sasaki et al. 2008; Barker et al. 2010).

Canine hemoplasmas were found in all age groups (Table 2). There was not found statistically significant differences between the prevalence of different age groups in the present study. This result was compatible with the studies conducted in different countries like Switzerland (Wengi et al. 2008), Italy (Ravagnan et al. 2017), Turkey (Aktas and Ozubek 2017; Aktas and Ozubek 2018), and the USA (Compton et al., 2012). Furthermore, our results revealed that the prevalence of canine hemoplasmas was more prevalent among the older age groups (3-4 years and ≥ 5 years) than younger age group (0-2 years) (Table 2). This finding could be attributed to that older animals are more exposed to ectoparasites (ticks or fleas) compared to the younger ones. Due to this, we thought that vector-borne pathogens like canine hemoplasmas are more prevalent in older animals. Normally, canine hemoplasmas should be more prevalent in ≥ 5 years' dogs than 3-4 years, but these pathogens were found more prevalent in 3-4 years' dogs (Table 2). This result could be related to the successful tick control by owners of these dogs that are older than 5 years old.

Mycoplasma haemocanis and *Ca. M. haematoparvum* were found in all sampling areas; Sivas city center, Kangal, Hafik, and Yildizeli, and the prevalences were 18.84%, 13.33%, 11.11%, and 14.28%, respectively. The difference between the sampling areas was not statistically significant. This result could be related to that the climate conditions of all sampling areas are similar. The climate conditions in geographical areas can directly affect distribution and abundance of vector species, and hence the prevalence of pathogens, especially vector-borne pathogens (Wengi et al. 2008; Novacco et al. 2010; Maggi and Krämer 2019). Probably because of that, we did not find statistically significant differences between the sampling areas.

In conclusion, vector-borne diseases (VBDs) are the main health problem in the world and are threat to both animal and human health. *M. haemocanis* and *Ca. M. haematoparvum* are one of important vector-borne diseases for dog populations. Moreover, these species also infect humans (Maggi et al. 2013). For this reason, determination of these pathogens in dog populations is vital to protect both animal and human health. To better understand the prevalence and the presence of *M. haemocanis* and *Ca. M. haematoparvum* in Sivas, there need to be

more comprehensive surveys, including domestic and wild canine species.

Ethic statement: Permission was obtained from the Sivas Cumhuriyet University Animal Experiments Local Ethics Committee (Approval number: 16.03.2021-513).

Acknowledgments: The authors thank Dr. Mehmet Fatih AYDIN (Department of Public Health, Faculty of Health Sciences, University of Karamanoglu Mehmetbey, Turkey) for providing positive control DNA's of *Mycoplasma haemocanis* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* and also, we are grateful to Veterinarians Anil Berat Mutlu, Enes KARAKAYA, and Eren ÇAMDALI for their kind help during sample collection.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflicts.

References

- Aktas M, Ozubek S. (2017) Molecular survey of haemoplasmas in shelter dogs and associations with *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. *Med Vet Entomol.* 31(4), 457-461. doi: 10.1111/mve.12244.
- Aktas M, Ozubek S. (2018) A molecular survey of hemoplasmas in domestic dogs from Turkey. *Vet Microbiol.* 221, 94-97. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.06.004.
- Altay K, Aydın MF, Aytmirzakizi A, Jumakanova Z, Cunosova A, Dumanlı, N. (2020a) First molecular evidence for *Mycoplasma haemocanis* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in asymptomatic shelter dogs in Kyrgyzstan. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 26(1), 143-146. doi: 10.9775/kvfd.2019.22196
- Altay K, Atas AD, Ograk YZ, Ozkan E. (2020b) Survey of *Theileria*, *Babesia* and *Anaplasma* Infections of Cattle and Ticks from Sivas Region of Turkey. *Erciyes Univ Vet Fak Derg.* 17(1), 32-38. doi: 10.32707/ercivet.690618
- Altay K, Atas AD, Ozkan E. (2017) Molecular Survey of *Theileria* and *Babesia* Species in Small Ruminants and Ticks from Sivas Region of Turkey. *Manas J Agricul Vet Life Sci.* 7(1), 30-39.
- André MR, Adania CH, Allegretti SM, Machado RZ. (2011) Hemoplasmas in wild canids and felids in Brazil. *J Zoo Wildl Med.* 42(2), 342-347. doi: 10.1638/2010-0198.1.
- Aquino LC, Kamani J, Haruna AM, Paludo GR, Hicks CA, Helps CR, Tasker S. (2016) Analysis of risk factors and prevalence of haemoplasma infection in dogs. *Vet Parasitol.* 221, 111-117. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.03.014.
- Atas AD, Altay K, Alim A, Ozkan, E. (2018) Survey of *Dirofilaria immitis* in dogs from Sivas Province in the Central Anatolia Region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 42(2), 130-134. doi:10.3906/vet-1707-93.
- Baker E, Tasker S. (2016) Haemoplasmosis. In: Day, M.J. (Ed.): Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. CRC Press, New York, pp.97-107.
- Barker EN, Tasker S, Day MJ, Warman SM, Woolley K, Birtles R, Georges KC, Ezeokoli CD, Newaj-Fyzul A, Campbell MD, Sparagano OA, Cleaveland S, Helps CR. (2010) Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*

- in dogs. *Vet Microbiol.* 140, 167–170. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.07.006.
- Chalker VJ. (2005) Canine mycoplasmas. *Res Vet Sci.* 79(1), 1-8. doi: 10.1016/j.rvsc.2004.10.002.
- Compton SM, Maggi RG, Breitschwerdt EB. (2012) *Candidatus* *Mycoplasma haematoparvum* and *Mycoplasma haemocanis* infections in dogs from the United States. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 35(6), 557-562. doi: 10.1016/j.cimid.2012.06.004.
- Guo H, Sevinc F, Ceylan O, Sevinc M, Ince E, Gao Y, Moumouni PFA, Liu M, Efstratiou A, Wang G, Cao S, Zhou M, Jirapattharasate C, Ringo AE, Zhenh W, Xuan X. (2017) A PCR survey of vector-borne pathogens in different dog populations from Turkey. *Acta Parasitol.* 62(3) 533-540. doi: 10.1515/ap-2017-0064.
- Inokuma H, Oyamada M, Davoust B, Boni M, Dereure J, Bucheton B, Hammad A, Watanabe M, Itamoto K, Okuda M, Brouqui P. (2006) Epidemiological survey of *Ehrlichia canis* and related species infection in dogs in eastern Sudan. *Ann NY Acad Sci.* 1078, 461-463. doi: 10.1196/annals.1374.085.
- Kenny MJ, Shaw SE, Beugnet F, Tasker S. (2004) Demonstration of two distinct hemotropic mycoplasmas in French dogs. *J Clin Microbiol.* 42(11), 5397-5399. doi: 10.1128/JCM.42.11.5397-5399.2004.
- Maggi RG, Krämer F. (2019) A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasit Vectors.* 12(1), 1-37. doi: 10.1186/s13071-019-3407-x.
- Maggi RG, Mascarelli PE, Havenga LN, Naidoo V, Breitschwerdt EB. (2013) Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus* *Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. *Parasit Vectors.* 6(1), 1-10. doi: 10.1186/1756-3305-6-103.
- Messick JB. (2004) Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Pathol.* 33(1), 2-13. doi: 10.1111/j.1939-165x.2004.tb00342.x.
- Novacco M, Meli ML, Gentilini F, Marsilio F, Ceci C, Pennisi MG, Lombardo G, Lloret A, Santos L, Carrapic T, Willi B, Wolf G, Lutz H, Hofmann-Lehmann, R. (2010) Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Vet Microbiol.* 142(3-4), 276-284. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.069.
- Ravagnan S, Carli E, Piseddu E, Da Rold G, Porcellato E, Zanardello C, Carminato A, Vascellari M, Capelli G. (2017) Prevalence and molecular characterization of canine and feline hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in northern Italy. *Parasit Vectors.* 10(1), 132. doi: 10.1186/s13071-017-2069-9.
- Sasaki M, Ohta K, Matsuu A, Hirata H, Ikadai H, Oyamada T. (2008) A molecular survey of *Mycoplasma haemocanis* in dogs and foxes in Aomori Prefecture, Japan. *J Protozool Res.* 18(2), 57-60. doi: 10.32268/jprotozoolres.18.2_57
- Sykes JE, Bailiff NL, Ball LM, Foreman O, George JW, Fry MM. (2004) Identification of a novel hemotropic mycoplasma in a splenectomized dog with hemic neoplasia. *J Am Vet Med Assoc.* 224(12), 1946-1951. doi: 10.2460/javma.2004.224.1946.
- Sykes JE, Ball LM, Bailiff NL, Fry MM. (2005) '*Candidatus* *Mycoplasma haematoparvum*', a novel small hemotropic mycoplasma from a dog. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55(1), 27-30. doi: 10.1099/ijs.0.02989-0.
- Torkan S, Aldavood SJ, Sekhvatmandi A, Moshkelani S. (2014) Detection of hemotropic *Mycoplasma* (Haemobartonella) using multiplex PCR and its relationship with epidemiological factors in dogs. *Comp Clin Pathol.* 23(3), 669-672. doi: 10.1007/s00580-012-1668-2.
- Wengi N, Willi B, Boretti FS, Cattori V, Riond B, Meli ML, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. (2008) Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. *Vet Microbiol.* 126(1-3), 132-141. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.06.018.
- Willi B, Novacco M, Meli ML, Wolf-Jäckel GA, Boretti FS, Wengi N, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. (2010) Haemotropic mycoplasmas of cats and dogs: transmission, diagnosis, prevalence and importance in Europe. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 152(5), 237. doi: 10.1024/0036-7281/a000055.



Investigation of ruminant encephalitic and septicemic listeriosis by the immunofluorescence method

Emin Karakurt^{1*}, Fatih Büyük², Serpil Dağ³, Enver Beytut⁴, Özgür Çelebi⁵,
Özhan Karataş⁶, Hilmi Nuhoglu⁷, Ali Sefa Mendil⁸, Doğan Akça⁹, Ayfer Yıldız¹⁰

^{1,3,4,7,10} Kafkas University, Veterinary Faculty, Pathology Department, Kars, Turkey

^{2,5} Kafkas University, Veterinary Faculty, Microbiology Department, Kars, Turkey

⁶ Cumhuriyet University, Veterinary Faculty, Pathology Department, Kars, Turkey

⁸ Erciyes University, Institute Health Sciences, Kayseri, Turkey

⁹ Kafkas University, Health Science Faculty, Midwifery Department, Kars, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 05.06.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 20.04.2021

Abstract: *Listeria* genus is Gram-positive facultative intracellular bacteria that are found in the soil as saprophytes but also contain species that have pathogenic effects in their last host. *Listeria monocytogenes* is the major pathogen in *Listeria* species that is responsible for the majority of Listeriosis cases in humans and animals. In this study, it was aimed to investigate *L. monocytogenes* with histopathological and immunofluorescence (IF) methods in brain and liver tissues taken from sheep and cattle with clinical signs of suspicious Listeriosis. In the study, isolation and identification of *L. monocytogenes* with cultural methods were also applied. The material of the study consisted of tissue samples from 16 sheep and 2 cattle. As a result of cultural analysis, *L. monocytogenes* was identified from 12 (66.6%) of cases. Within the framework of histopathological and macroscopic findings, 16 (88.8%) of 18 cases with suspected Listeriosis were positive with the immunofluorescence method. These findings reveal that the immunofluorescent staining method is a reliable and sensitive method in the diagnosis of Listeriosis.

Keywords: Cattle, immunofluorescence, listeriosis, sheep

Ruminantların ensefalitik ve sepsisemik listeriyozisinin immunfloresan metotla araştırılması

Özet: *Listeria* cinsi toprakta saprofit olarak bulunan ancak aynı zamanda son konaklarında patojenik etkilere sahip türler içeren Gram-pozitif fakültatif intraselüler bakterilerdir. *Listeria monocytogenes*, insanlarda ve hayvanlarda Listeriosis vakalarının çoğundan sorumlu olan *Listeria* türlerindeki başlıca patojendir. Bu çalışmada, Listeriyozis şüpheli klinik belirti gösteren koyun ve sığırlardan alınan beyin ve karaciğer dokularında *L. monocytogenes*'in histopatolojik ve immunfloresan metotlarla araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada *L. monocytogenes*'in kültürel yöntemlerle izolasyonu ve identifikasyonu da uygulanmıştır. Çalışmanın materyalini, 16 koyun ve iki sığıra ait doku örnekleri oluşturmuştur. Kültürel analiz sonucunda vakaların 12 (%66,6)'sinden *L. monocytogenes* identifiye edilmiştir. Histopatolojik ve makroskopik bulgular çerçevesinde Listeriyozis şüpheli 18 vakanın 16 (%88,8)'sı immunfloresan metotla pozitif tespit edilmiştir. Bu bulgular, immunfloresan boyama yönteminin Listeriyozisin teşhisinde güvenilir ve hassas bir yöntem olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: İmmunfloresan, koyun, listeriyozis, sığır

Introduction

Listeria spp. are saprophytic, Gram-positive bacteria that are distributed widely in the environment (Nightingale et al. 2004; Fairley et al. 2012; Rocha et al. 2013). The genus *Listeria* consists of the currently known species *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, and *L. welshimeri* (Liu et al. 2004). Only two of these six species are known to be pathogenic: *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* (Oevermann et al. 2010). Especially, *L. monocytogenes* is responsible for about 98% of human and 85% of animal cases of listeriosis (Kaur et al. 2010). Listeriosis

is a sporadic, infrequently seen as an enzootic disease of ruminants. This disease causes significant economic losses in sheep, cattle, and goats. (Dag et al. 2013). Listeriosis is mostly detected in autumn, winter, and early spring in temperate and cold climates and there is a direct link between poorly prepared silage feeding and infection (Wesley et al. 2002; Brugère-Picoux 2008). This disease is more common in sheep than in cattle (Çeribaşı et al. 2013). The most important clinical symptoms caused by *L. monocytogenes* in ruminants are briefly as follows: septicemia, meningoenphalitis,

Yazışma adresi / Correspondence: Emin Karakurt, Kafkas University, Veterinary Faculty, Pathology Department, Kars, Turkey
E-posta: mehmeteminkarakurt@hotmail.com

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0003-2019-3690 • ²0000-0003-3278-4834 • ³0000-0001-7667-689X •
⁴0000-0003-3360-2940 • ⁵0000-0002-3478-008X • ⁶0000-0002-2778-8059 • ⁷0000-0003-2530-2542 • ⁸0000-0003-2722-3290 •
⁹0000-0002-3986-8769 • ¹⁰0000-0002-6569-5435

metritis with abortion (Barkallah et al. 2016; Haligur et al. 2019). In encephalitic form; multifocal microabscesses, meningoencephalitis, glial nodules, perivascular cuffing are the main histopathological features (Özyıldız et al. 2018). Multiple necroses and numerous abscess foci in the liver are seen in septicemic listeriosis (Low and Donachie 1997). Moreover, *L. monocytogenes* is an important foodborne pathogen for humans and poses a major problem on public health (Dreyer et al. 2015). Human cases are mostly associated with the ingestion of contaminated milk and/or milk products (Headley et al. 2014).

Definitive diagnosis of listeriosis is based on the isolation and identification of the agent by bacteriological culture techniques. Some alternatives may helpful in diagnosis to detect *Listeria spp.* or erupted antibodies with PCR and serological techniques, respectively (Gasnov et al. 2005). However, all these techniques have some drawbacks such as requiring equipped laboratory environment and personnel and time-consuming and labour-intensive efforts, as well. Thus, a simple and reliable technique is always needed in the diagnosis of *Listeria* agents. Immunological methods using monoclonal or polyclonal antibodies have been demonstrated to give promising results for rapid detection of *L. monocytogenes* in various samples (Ralovich 1993). These antibodies labeled with the fluorescent compound can identify the target antigens on smears prepared from tissues when examined with a fluorescence microscope which is called a direct immunofluorescence assay (Chen et al. 2017).

In this study, it was aimed to evaluate the samples of brain and liver tissue from sheep and cattle with encephalitic and septicemic listeriosis associated with *Listeria monocytogenes* by histopathological and immunofluorescence methods.

Material and Methods

Animals

Study materials were obtained from adult 16 sheep and 2 cattle admitted to The Pathology Department and Microbiology Department of Veterinary Faculty, Kafkas University, for necropsy. These animals had various clinical symptoms, including anorexia, depression, unable to stand up, hypersalivation, sagging in the lower lip, paralysis in the eyelid, abortion, circling movement, opisthotonus, loss of coordination, unilateral blindness, amaurosis, and torticollis.

Microbiological Analysis

In this study, brain and liver tissues of all animals and also kidney and heart samples from one sheep (Case No.7) were cultivated in accordance with the USDA-FSIS method reported by McClain and Lee (1988) with some minor modifications. In brief 2.5 g tissue was transferred to 22.5 ml Pre-Enrichment Broth (Trypticase Soy Broth (Merck 1.05459) containing 0.6% yeast extract and the broth was incubated microaerobically at 30 °C for 24 hours. At the end of the incubation, 1 ml Pre-enrichment Broth was transferred into 9 ml *Listeria* Enrichment Broth (UVM formulation) (Oxoid CM0863), and the latter was incubated at 30 °C at the same conditions. Then, *Listeria* Selective Agar (LSA) (Oxoid, CM0856) was plated with 25 µl aliquot of *Listeria* Enrichment Broth and the plates were incubated microaerobically for 24 hours at 30°C. Initial identification was performed with the presence of bright grey-black centered smooth colonies on the LSA medium which was considered as *Listeria spp.* Future identification was performed through Gram staining characteristics, mobility at 25°C, catalase and oxidase activities, carbohydrate (L-rhamnose, D-mannitol, D-xylose, and α-methylmannosidase) fermentation capabilities, and CAMP activities with control strains of *Rhodococcus equi* (ATCC-33701) and *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) (FDA, 2015).

Histopathological examination

Tissue samples of brain and liver from 16 sheep and two cattle and in addition to these, kidney and heart samples from only one sheep (Case No.7) were fixed in a 10% neutral buffered formalin solution. After routine tissue procedures follow-up, 5 µm thick sections were taken from paraffin blocks. In order to detect histopathological changes, Hematoxylin & Eosin (H&E) stain was applied to the sections. Sections were examined under a light microscope (Olympus Bx53) and photographed with Cell ^P Program (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, 3,4).

Immunofluorescence staining

Direct immunofluorescence staining protocol was carried out to detect *L. monocytogenes* antigens on tissue sections. Briefly, liver, brain, negative and positive tissues from cattle and sheep were fixed in a 10% neutral buffered formalin solution. Tissues were routinely followed by alcohol-xylool follow-up and taken into paraffin blocks. Sections of 5 µm taken into poly-L-lysine sections were passed

through xylol and alcohol series. Sections were treated with antigen retrieval solution at 500 watts for 2 x 5 minutes to reveal the antigen in the tissues. The tissues washed with PBS were then incubated for 10 minutes in 1% Bovine Serum Albumin (BSA) and then incubated with *L. monocytogenes* (LSBio Catalog no: LS-C56360) primary antibody for 45 minutes at 37°C. Then, it was washed with distilled water and the sections were covered with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) fluorescence medium. Results obtained under fluorescence microscope were evaluated as negative (-), mild (+), moderate (++), and severe (+++).

Results

Microbiological Results

In this study, *Listeria spp.* were isolated from 12 (66.6%) animals, one cattle, and 11 sheep (Table

1). The isolates had some characteristics such as the presence of colonies with certain morphology on LSA, typical microscopic morphologies (0.4-0.5 µm wide and 1-2 µm long, non-spore-forming Gram-positive bacilli), catalase-positive and oxidase negative activities and motility at 25°C. All isolates were further identified as *L. monocytogenes* as the result of L-rhamnose and α-methyl-mannosidase activities and positive CAMP reaction with *S. aureus*.

Macroscopical results

In addition to marked congestion in the brain, it was detected an increase in opacity and thickening in meninges (Figure 1A). In the liver, white foci of pin size spread across the entire organ were observed (Figure 1B). It was detected nodular structures in the heart in only one case (Figure 1C). It did not observe any macroscopic findings in kidney tissue (Figure 1D).

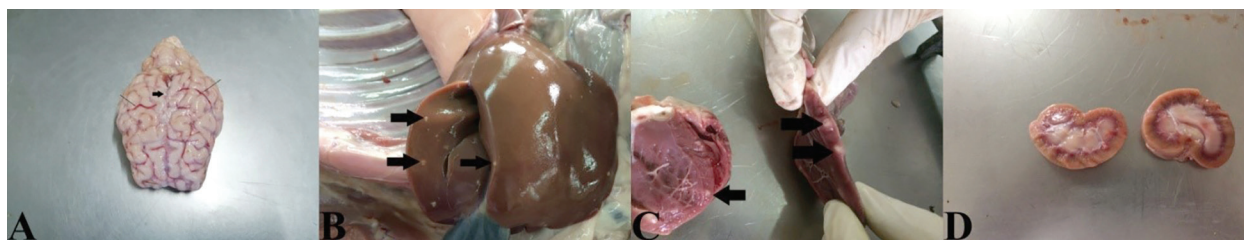


Figure 1. **A:** Brain, congestion (thin arrows) and meningeal opacity and thickening (thick arrow), **B:** Liver, white foci of pin size spread across the entire organ (arrows), **C:** Heart, nodular structures (arrows), **D:** Kidney, there was no macroscopically significant finding (granulomatous case).

Microscopical results

The findings observed in the histopathological examination of brain tissues were briefly as follows: extensive coagulative necrosis areas and intense neutrophil infiltrations around these areas (Figure 2A), meningitis (Figure 2B), microabscesses (Figure 2C), perivascular cuffs consisting mainly of lymphocytes with histiocytes, plasma cells and a small number of neutrophils (Figure 2C), gliosis (Figure 2D) (Table 1).

In addition to these findings observed in the brain, it was detected areas of necrosis in the liver (Figure 3A), perivascular cell infiltrations (Figure 3A-B), numerous abscess foci (Figure 3C), granulomatous structure (Figure 3D), giant cell (Figure 3D), degeneration in hepatocytes (Figure 3D), hemorrhage and proliferation in the bile ducts. It was detected granulomatous structures in the kidney and heart in only one case (Figure 4A-B) (Table 1).

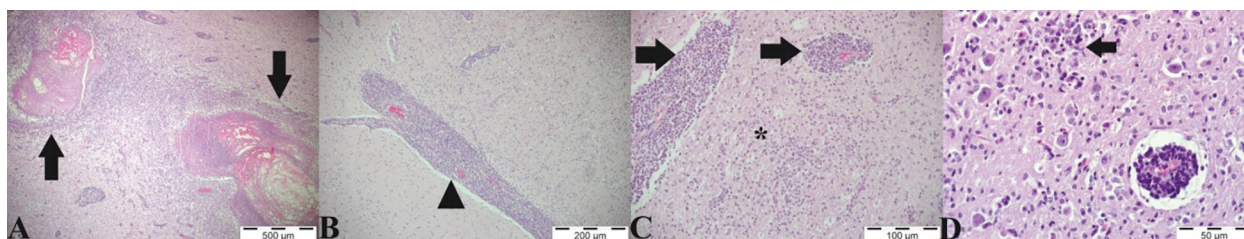


Figure 2. **A:** Brainstem, Extensive coagulative necrosis areas and intense neutrophil infiltrations around these areas (arrows), H&E, Bar=500 µm **B:** Brainstem, Meningitis (arrowhead), H&E, Bar=200 µm **C:** Brainstem, Perivascular cuffing (arrows) and microabscess (star), H&E, Bar=100 µm **D:** Brainstem, Gliosis, H&E, Bar=50 µm.

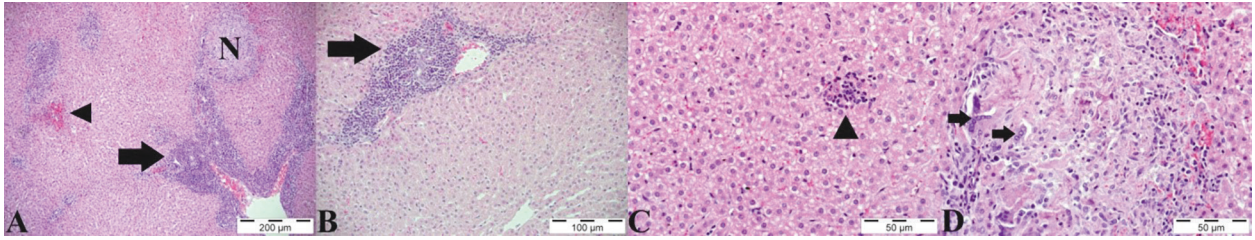


Figure 3. A: Liver, Necrosis (N), perivascular cellular infiltration (arrow) and hemorrhage (arrowhead), H&E, Bar=200 µm **B:** Liver, perivascular cellular infiltration (arrow), H&E, Bar=100 µm **C:** Liver, degenerate hepatocytes and microabscess (arrowhead), H&E, Bar=50 µm **D:** Liver, granuloma, giant cells (arrows), H&E, Bar=50 µm.

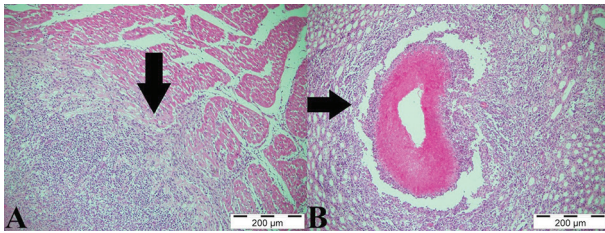


Figure 4. A: Heart, granuloma, H&E, Bar=200 µm **B:** Kidney, granuloma, H&E, Bar=200 µm.

Immunofluorescence staining results

As the result of IF staining, 16 (88.8%) of 18 cases with suspected Listeriosis were positive (Table 1). In the sections used for control purposes, we observed nonspecific fluorescence luminescence only in erythrocytes. In IF evaluations, it was detected *L. monocytogenes* antigens diffusely located in the cytoplasm of hepatocytes (Figure 5A-B). In the brain, it was observed that the antigens were diffuse in the cytoplasm of neurons, similar to that in liver findings (Figure 6A-D).

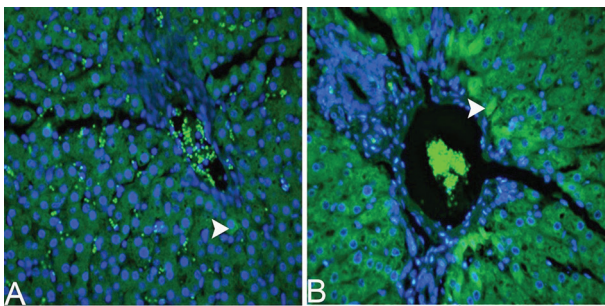


Figure 5. A-B: *Listeria monocytogenes* positivity in the cytoplasm of hepatocytes (arrowhead). Liver, IF method, 20x.

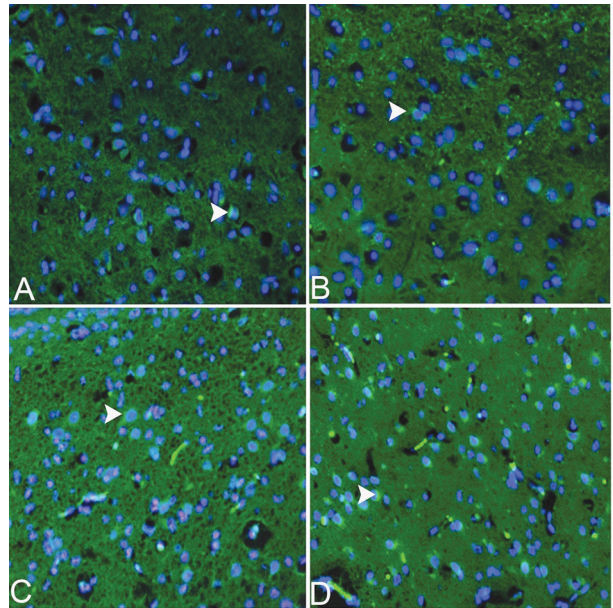


Figure 6. A-B-C-D: *Listeria monocytogenes* positivity in the cytoplasm of neurons (arrowhead), Brain, IF method, 20x.

Discussion

Listeriosis, caused primarily by *L. monocytogenes*, is a common infectious disease reported in countries on over six continents and in more than 40 species of domesticated and wild animals. However, this disease is an important health problem especially for ruminants (Langohr et al. 2006). Encephalitic listeriosis is observed most in sheep among ruminants (Campero et al. 2002). In our study, in accordance with the literature data (Campero et al. 2002), listeriosis positive cases were mostly detected in sheep. Generally, Listeriosis is detected more often in winter and early spring and is thought to be related to poorly prepared silage consumption (Al-Dughaym et al. 2001; Wesley et al. 2002). The

animals included in our study consisted mostly of sheep brought to our department, especially in winter, similar to the literature data (Al-Dughaym et al. 2001; Campero et al. 2002; Wesley et al. 2002). Listeriosis can be evaluated pathologically under three main headings. The first of these; infection of the pregnant uterus and late-term abortions, the second is septicemia characterized by milier visceral abscesses (liver, spleen, and other organs) and the third is encephalitis (Ortatatlı et al. 2001; Nightingale et al. 2004; Headley et al. 2014). The clinical manifestations of Listeriosis are a result of the lesions in the brain stem and although individual cases vary, common symptoms include apathy, fever, anorexia, depression, abortion, septicemia, conjunctivitis, nystagmus, facial and tongue paralysis, dullness, turning or twisting of the head to one side and walking in circles (Low and Donachie 1997; Dons et al. 2007; Brugère-Picoux 2008; Çeribaşı et al. 2013). Death occurs 2-3 days after the clinical symptoms are observed in sheep. This period is longer in cattle (Low and Donachie 1997). In the animals of our study, consistent with the literature (Low and Donachie 1997; Ortatatlı et al. 2001; Brugère-Picoux 2008; Çeribaşı et al. 2013), clinical symptoms such as anorexia, depression, unable to stand up, hypersalivation, sagging in the lower lip, paralysis in the eyelid, abortion, circling movement, opisthotonus, loss of coordination, unilateral blindness, amaurosis, and torticollis were observed.

Macroscopic lesions in listeriosis are generally not remarkable (Rocha et al. 2013). However, it is known that sometimes the membranes covering the medulla oblongata are thickened due to greenish gelatinous edema and there are a few mm diameter melting areas on the sectional face of the medulla oblongata. (Ortatatlı et al. 2001). Significant congestion and blurred meningeal edema have also been reported (Al-Dughaym et al. 2001; Headley et al. 2014; Haligur et al. 2019). Focal hepatic necrosis and white nodules are observed in the liver (Low and Donachie 1997). Pyogranulomas can be observed in lymph nodes, lungs, liver, spleen, and kidneys (Dreyer et al. 2015). In our study, similar to previous studies (Al-Dughaym et al. 2001; Headley et al. 2014; Haligur et al. 2019), we found an increase in opacity and thickening and significant congestion in meninges. We also detected white nodules spread over the entire organ surface in the liver, similar to that reported by Low and Donachie (1997). In just one case, in addition to macroscopic lesions in the liver and brain, we encountered nodular areas in the heart. Although macroscopic findings in the kidney

are not remarkable, we observed granulomatous structures in the histopathological examination of this organ, as reported by Dreyer et al. (2015).

In previous studies, microabscesses (Oevermann et al. 2010; Rocha et al. 2013; Henke et al. 2015), foci of malacia infiltrated by neutrophils (Johnson et al. 1995; Al-Dughaym et al. 2001; Ortatatlı et al. 2001; Campero et al. 2002), meningoencephalitis (İlhan et al. 2012; Headley et al. 2014), perivascular cuffs consisting mainly of lymphocytes with histiocytes, plasma cells and infrequent neutrophils (Low and Donachie 1997; Çeribaşı et al. 2013; Özyıldız et al. 2018; Haligur et al. 2019), gliosis (Ligios et al. 2004; Loeb 2004; İlhan et al. 2012; Özyıldız et al. 2018), multiple foci of necrosis of the liver (Brugère-Picoux 2008) have been observed. Similar to the results of these researchers, we observed large areas of necrosis, microabscesses, meningoencephalitis, gliosis, and perivascular cuffing in the brain. In addition, we determined necrosis in the liver, numerous abscess foci, and perivascular cell infiltrations, in correlation with the findings of some researchers (Low and Donachie 1997; Brugère-Picoux 2008). We detected granulomatous structures in the kidney and heart in only one case similar to the literature data (Dreyer et al. 2015).

In the diagnosis of listeriosis, besides bacteriological culture techniques, immunohistochemical staining, electron microscopy, ELISA, and PCR methods are also used. However, all these techniques have some disadvantages. (Weinstock et al. 1995; Loeb 2004; Kaur et al. 2010; Dag et al. 2013; Özyıldız et al. 2018). We couldn't find literature data in which the presence of *L. monocytogenes* in adult sheep and cattle was evaluated by immunofluorescence staining. There are few immunofluorescence studies evaluating the brain cells of cattle and embryonic rats (Dramsi et al. 1998; Henke et al. 2015).

In conclusion, based on histopathological and macroscopic findings, 16 of 18 cases in which we suspected Listeriosis were positively diagnosed by the immunofluorescence method. It was thought that the difference between culture results and immunofluorescence results is in favor of immunofluorescence due to specific binding. Within the scope of the results obtained from our study, we think that immunofluorescence staining is a very reliable and sensitive method in the diagnosis of Listeriosis. We believe that the results of immunofluorescence staining will contribute to the literature in terms of diagnosis of encephalitic and septicemic listeriosis in ruminants.

Table 1. Comparison of the results of diagnostic tests for all animals.

Case No	Species	Sample Type	Histopathological Results	Microbiological Results	IF Results	Severity of IF Expressions
1	Cattle	Liver	N	-	-	-
		Brain	ME	-	-	-
2	Sheep	Liver	N	-	+	++
		Brain	ME, MA, N, PC, G	-	+	++
3	Sheep	Liver	N, PCİ, A	-	+	+
		Brain	E	-	-	-
4	Sheep	Liver	N	-	-	-
		Brain	ME, MA, N, PC, G	-	+	++
5	Sheep	Liver	N	-	-	-
		Brain	ME, PC	-	+	+
6	Sheep	Liver	N	-	-	-
		Brain	ME	-	-	-
7	Sheep	Liver	N	+	+	+++
		Brain	ME	+	+	+++
		Heart	GR	+	-	-
		Kidney	GR	+	-	-
8	Sheep	Liver	N, PCİ, A	+	+	+++
		Brain	ME, MA, N, PC, G	+	+	+++
9	Sheep	Liver	N, PCİ, A	+	+	+++
		Brain	ME, MA, N, PC, G	+	+	+++
10	Sheep	Liver	N, PCİ, A	+	+	+++
		Brain	ME, MA, N, PC, G	+	+	+++
11	Sheep	Liver	N, PCİ	+	+	++
		Brain	ME, MA, N, PC, G	+	+	++
12	Sheep	Liver	N	+	-	-
		Brain	ME, PC	+	+	+
13	Sheep	Liver	N, PCİ, A	+	+	++
		Brain	ME, MA, N, PC, G	+	+	++
14	Sheep	Liver	N, PCİ, A	+	+	+++
		Brain	ME, MA, N, PC, G	+	+	+++
15	Sheep	Liver	N, PCİ, A	+	+	+++
		Brain	ME, MA, N, PC, G	+	+	+++
16	Cattle	Liver	N, PCİ	+	+	+++
		Brain	ME, MA, N, PC, G	+	+	+++
17	Sheep	Liver	N	+	+	++
		Brain	ME, MA, N, PC, G	+	+	++
18	Sheep	Liver	N, PCİ, A	+	+	+++
		Brain	ME, MA, N, PC, G	+	+	+++
Total Number of Positive Cases				12	16	

N: Necrosis, ME: Meningoencephalitis, MA: Microabscesses, PC: Perivascular cuffing, G: Gliosis, GR: Granuloma, PCİ: Perivascular cell infiltrations, A: abscess

Ethical statement: The ethics committee report of this study was obtained from Kafkas University Animal Experiments Local Ethics Committee (Authorization number: KAU-HADYEK-2020/075).

Conflict of Interest Statement: The authors declare no conflicts of interest with respect to the publication of this manuscript.

References

- Al-Dughaym AM, Elmula AF, Mohamed GE, Hegazy AA, Radwan YA, Housawi FM, Gameel AA. (2001) First report of an outbreak of ovine septicemic listeriosis in Saudi Arabia. *Rev Sci Tech*. 2001; 20, 777-783.
- Barkallah M, Gharbi Y, Hmani M, Mallek Z, Gautier M, Gdoura R, Fendri I. (2016) Locked nucleic acid probe-based real-time PCR for the diagnosis of *Listeria monocytogenes* in ruminants. *Mol Cell Probes*. 30, 138-145.
- Brugère-Picoux J. (2008) Ovine listeriosis. *Small Ruminant Res*. 76, 12-20.
- Campero CM, Odeón AC, Cipolla AL, Moore DP, Poso MA, Odriozola E. (2002) Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 49, 379-383.
- Çeribaşı S, Kızıl Ö, Karahan M. (2013) Listeriyozisli koyunlarda klinik, patolojik ve mikrobiyolojik bulgular. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*. 27, 1-5.
- Chen JQ, Regan P, Laksanalamai P, Healey S, Hu Z. (2017) Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources. *FSHW*. 6, 97-120.
- Dag S, Akca D, Karaman D, Celebi O, Ozen H, Buyuk F, Sahin M. (2013) Investigation of immunoperoxidase technique in smears prepared from vaginal secretions in use of early diagnosis of listerial abortions in cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 19, 1-6.
- Dons L, Jin Y, Kristensson K, Rottenberg ME. (2007) Axonal transport of *Listeria monocytogenes* and nerve-cell-induced bacterial killing. *J Neurosci Res*. 85, 2529-2537.
- Dramsı S, Lévi S, Triller A, Cossart P. (1998) Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study. *Infect Immun*. 66, 4461-4468.
- Dreyer M, Thomann A, Böttcher S, Frey J, Oevermann A. (2015) Outbreak investigation identifies a single *Listeria monocytogenes* strain in sheep with different clinical manifestations, soil and water. *Vet Microbiol*. 179, 69-75.
- Fairley RA, Pesavento PA, Clark RG. (2012) *Listeria monocytogenes* infection of the alimentary tract (enteric listeriosis) of sheep in New Zealand. *J Comp Pathol*. 146, 308-313.
- Food and Drug Administration (FDA). (2015) Testing methodology for *Listeria* species or *L. monocytogenes* in environmental samples. Version 1, Pp.2-11.
- Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. (2005) Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review. *FEMS Microbiol Rev*. 29, 851-875.
- Haligur M, Aydoğan A, Özmen O, Ipek V. (2019) Immunohistochemical evaluation of natural cases of encephalitic listeriosis in sheep. *Biotech Histochem*. 94, 341-347.
- Headley SA, Bodnar L, Fritzen JT, Bronkhorst DE, Alfieri AF, Okano W, Alfieri AA. (2014) Histopathological and molecular characterization of encephalitic listeriosis in small ruminants from northern Paraná, Brazil. *Braz J Microbiol*. 44, 889-896.
- Henke D, Rupp S, Gaschen V, Stoffel MH, Frey J, Vandeveld M, Oevermann A. (2015) *Listeria monocytogenes* spreads within the brain by actin-based intra-axonal migration. *Infect Immun*. 83, 2409-2419.
- İlhan F, Ulusoy Y, Haligür M. (2012) Matrix metalloproteinase expression in sheep with listerial meningoencephalitis. *Res Vet Sci*. 92, 269-272.
- Johnson GC, Fales WH, Maddox CW, Ramos-Vara JA. (1995) Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants. *J Vet Diagn Invest*. 7, 223-228.
- Kaur S, Malik SV, Bhilegaonkar KN, Vaidya VM, Barbuddhe SB. (2010) Use of a phospholipase-C assay, in vivo pathogenicity assays and PCR in assessing the virulence of *Listeria* spp. *Vet J*. 184, 366-370.
- Langohr IM, Ramos-Vara JA, Wu CC, Froderman SF. (2006) Listeric meningoencephalomyelitis in a cougar (*Felis concolor*): Characterization by histopathologic, immunohistochemical, and molecular methods. *Vet Pathol*. 43, 381-383.
- Ligos C, Viglietti A, Carta P, Dexter G, Agrimi U, Simmons MM. (2004) Clinicopathological findings in sheep from Sardinia showing neurological signs of disease. *Vet Rec*. 154, 365-370.
- Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML. (2004) PCR detection of a putative N-acetylmuramidase gene from *Listeria ivanovii* facilitates its rapid identification. *Vet Microbiol*. 101, 83-89.
- Loeb E. (2004) Encephalitic listeriosis in ruminants: Immunohistochemistry as a diagnostic tool. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 51, 453-455.
- Low JC, Donachie W. (1997) A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J*. 153, 9-29.
- McClain D, Lee WH. (1988) Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. *J Assoc Off Anal Chem*. 71, 660-664.
- Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, Grohn YT, McDonough PL, Wiedmann M. (2004) Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl Environ Microbiol*. 70, 4458-4467.
- Oevermann A, Di Palma S, Doherr MG, Abril C, Zurbriggen A, Vandeveld M. (2010) Neuropathogenesis of naturally occurring encephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in ruminants. *Brain Pathol*. 20, 378-390.
- Ortatatlı M, Çiftçi MK, Tuzcu M. (2001) Bir koyun sürüsünde görülen purulent ensefalitis. *Vet Bil Derg*. 17, 97-102.
- Özyıldız Z, Dinçel GÇ, Terzi OS, Özsoy ŞY, Kul O. (2018) Immunohistochemical investigation of the damage to and repair of myelin, and astrocyte activity in small ruminants resulting from with natural meningoencephalitic listeriosis. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*. 65, 283-290.
- Ralovich B. (1993) Detection and epidemiological typing of *Listeria* strains – diagnostic methods for *Listeria* infections (A review). *Acta Microbiol Hung*. 40, 3-38.
- Rocha PR, Lomonaco S, Bottero MT, Dalmaso A, Dondo A, Grattarola C, Zuccon F, Iulini B, Knabel SJ, Capucchio MT, Casalone C. (2013) Ruminant rhombencephalitis-associated *Listeria monocytogenes* strains constitute a genetically homogeneous group related to human outbreak strains. *Appl Environ Microbiol*. 79, 3059-3066.
- Weinstock D, Horton SB, Rowland PH. (1995) Rapid diagnosis of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissue. *Vet Pathol*. 32, 193-195.
- Wesley IV, Larson DJ, Harmon KM, Luchansky JB, Schwartz AR. (2002) A case report of sporadic ovine listerial meningoencephalitis in Iowa with an overview of livestock and human cases. *J Vet Diagn Invest*. 14, 314-321.



Development of real-time PCR method for the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*

İnci Başak Müştak^{1*}, Mustafa Kolukırık²

^{1,2} Bioeksen R&D Technologies Co, Istanbul Technical University Ari Technopark, Istanbul/Turkey

Geliş Tarihi / Received: 08.02.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 22.03.2021

Abstract: Avian mycoplasmas are associated with respiratory disease, synovitis, poor quality of day-old chicks, and poor performance. The main approach used for the diagnosis of avian mycoplasmas is isolation and identification of the microorganism. Since the *Mycoplasma* are slow-growing fastidious organisms, conventional methods are time-consuming, laborious, and require experienced personnel. For this reason, we aimed to develop a rapid detection method for *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). For this purpose, the *lipoprotein (lp)* and *variable lipoprotein hemagglutinin (vlhA)* genes were used to detect *M. gallisepticum* and *M. synoviae*, respectively. The limit of detection (LOD) of the assay was determined to be $<10^1$ DNA/ μ l from artificially contaminated swab samples. The specificity and sensitivity ratios were detected 100%. Overall, these results indicate that this qPCR method can be accurately used for the detection of MG and MS.

Keywords: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, qPCR

Mycoplasma gallisepticum ve *Mycoplasma synoviae* teşhisi için real-time PCR yöntemi geliştirilmesi

Özet: Kanatlı mikoplazmaları solunum yolu hastalığı, sinovitis, günlük civcivlerin kalitesizliği ve düşük performans ile ilişkilidir. Kanatlı mikoplazmalarının teşhisinde kullanılan temel yaklaşım mikroorganizmanın izolasyonu ve identifikasyonudur. Mikoplazma yavaş ve zor üreyen organizmalar olduğundan, konvansiyonel yöntemler zaman alıcı, zahmetli ve deneyimli personel gerektirir. Bu nedenle, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile *Mycoplasma gallisepticum* (MG) ve *Mycoplasma synoviae* (MS) için hızlı bir tespit yöntemi geliştirmeyi amaçladık. Bu amaçla, sırasıyla *lipoprotein (lp)* ve *değişken lipoprotein hemagglütinin (vlhA)* genleri *M. gallisepticum* ve *M. synoviae*'nin teşhisi için kullanıldı. Yapay kontaminasyon yapılan svap örneklerinde, geliştirilen metodun deteksiyon limiti (LOD) $<10^1$ DNA/ μ l olarak belirlendi. Spesifite ve sensitivite oranları ise %100 olarak tespit edildi. Tüm sonuçlar, geliştirilen qPCR metodunun MG ve MS'nin doğru teşhisinde kullanılabilecek bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, qPCR

Introduction

Mycoplasma gallisepticum (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) are the most important avian *Mycoplasma* species worldwide in the poultry industry (Raviv et al. 2007). MG causes chronic respiratory disease (CRD) of chickens and infectious sinusitis in turkeys. It is characterized by nasal discharges, conjunctivitis, and coughing. MG cause also infectious sinusitis in turkeys. MS infection is commonly seen as a subclinical upper respiratory infection. MS may cause air sac lesions when combined with infectious bronchitis (IB) or Newcastle disease (ND). It may also cause infectious synovitis when becomes systematic (Lockaby et al. 1999). MG and MS infections are economically important diseases since they cause decreased egg production, reduced quality of day-old chicks,

growth rate, and increased costs of eradication procedures (Ley 2003).

Isolation and identification of *Mycoplasma* species is still considered the "gold standard" method for the diagnosis of the diseases (Kleven et al. 1991; Nascimento et al. 1991). However, replication of *Mycoplasma* species requires a complex medium consisted of serum, 3-5 or longer days, and 2-3 serial passages at 5 to 7-day intervals (Ley 2003). These methods are expensive, time-consuming, and laborious. Serological tests including the rapid slide agglutination test, the hemagglutination inhibition test, and ELISA to detect antibody production are used for the diagnosis of avian mycoplasmosis (Kleven et al. 1991; Yoder 1991). Polymerase chain reaction (PCR) based methods are alternatives for the detection of *Mycoplasma* species. Beside this,

Yazışma adresi / Correspondence: İnci Başak Müştak, Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Ankara, Turkey E-mail: incibasak@hotmail.com

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0001-9180-5768 • ²0000-0003-0426-2422

the culture of the bacteria is not required for the detection by PCR-based methods (Hess et al. 2007; Grodio et al. 2008). Detection of *Mycoplasma* species more rapid and highly specific by quantitative PCR methods has become the frontline approach (Carli and Eyigor 2003; Mekkes and Feberwee 2005; Callison et al. 2006; Grodio et al. 2008).

In this study, a quantitative real-time PCR (qPCR) method was developed for the molecular detection of MG and MS from poultry samples. The developed method was validated by determining the PCR efficiency, the limit of detection (LOD), and specificity tests. This approach was also aimed to screen the presence of MG and MS in poultry samples.

Material and Methods

Genomic DNA of Bacterial strains: The genomic DNA of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* strains were obtained from the collection of Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology.

Bio-Speedy® Universal Real-Time PCR Internal Control Kit, Cat No: BS-AMP-501 (Bioeksen R&D Technologies Ltd, Turkey) was used to monitor the integrity of PCR. For this purpose, 10 µL of the internal control template included in the kit was added to the DNA extract.

Primers and Probes: Detection of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* was performed using oligonucleotides targeting the *lipoprotein (lp)* and *variable lipoprotein hemagglutinin (vlhA)* genes, respectively. Probes were designed using Primer3 (v.0.4.0) software with an average length of 18-24 base pairs (bp), 5-8°C higher than the binding temperatures of forward and reverse primers determined for the same gene region, and GC content not exceeding 60% (in the patent submission process).

qPCR assay: The multiplex qPCR assay was optimized using Quant Studio-5 Real-Time PCR instrument (Applied Biosystems) and the specificity of two primer pairs were confirmed via single PCR. The PCR was optimized to conditions of 95°C for 5 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 50 s. Amplification of target genes was observed in the FAM and HEX channels for *M. gallisepticum/synoviae* and internal control, respectively.

A total of 10 µL of multiplex qPCR mix consisted of 5 µL of Bio-Speedy® Colorless 2X qPCR Mix (Bioeksen R&D Technologies Ltd, Turkey), primers and probes with different concentrations, 2 µL of

template nucleic acid to final volume. qPCR reaction setup details are given in Table 1.

The results were recorded as negative if there was no sigmoidal curve. The results were recorded as positive if $C_q < 37$. The analysis was repeated with the same nucleic acid extract if $C_q \geq 37$, if the result was $C_q \geq 37$ again, the test was repeated from the DNA extraction step.

Table 1. Multiplex qPCR reaction setup details.

Reagent	Final Concentration
Colorless 2X qPCR Mix (Bio-Speedy®, Cat No: BS-AMP-102)	1X
Oligomix (MG/MS)	500 nmol/L
Probe (MG/MS)	200 nmol/L
Internal Control Oligo Mix (Bio-Speedy®, Cat No: BS-AMP-501)	1 µL
Template Nucleic Acid	2 µL
Final Volume	10 µL

PCR Efficiency: Each *M. gallisepticum* and *M. synoviae* obtained from the collection of Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology were used for the PCR efficiency tests.

Nucleic acid samples of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* were diluted to working concentration (200 ng/µL). A 6-point dilution series of 1/2, 1/4, 1/16, 1/64, 1/256, and 1/1024 were prepared from DNA samples, starting from a concentration of 200 ng/µL. Each dilution was analyzed in duplicate by qPCR. Calibration curves were constructed with the C_q values obtained by the PCR test and the logarithm of the dilution factors. Compliance with the acceptance criteria required for PCR efficiency was evaluated by using the equations of the calibration curves.

Specificity: The specificity was tested wet with a total of 17 microorganisms genomic DNA extraction consisting of *Salmonella* Liverpool, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Infantis, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma iowae*, *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Avibacterium paragallinarum*.

Genomic DNA extraction was performed by using Bio-Speedy® Universal Nucleic Acid Isolation Kit, Cat No: BS-NA-121, and by adding 10 µL of the internal control template included in the Bio-Speedy® Universal Real-Time PCR Internal Control Kit, Cat No: BS-AMP-501 (Bioeksen R&D

Technologies Ltd, Turkey). All samples were tested in triplicate and the Cq values were observed in the related channels.

Limit of detection (LOD): Each *M. gallisepticum* and *M. synoviae* obtained from the collection of Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology were used in LOD studies.

For the LOD studies, a swab matrix was selected. 6-point dilution series of 1/2, 1/4, 1/16, 1/64, 1/256, and 1/1024 of DNA samples were prepared and swab samples artificially contaminated with target levels. The artificial contamination procedure was performed in five replicates for the swab matrix and each contamination level. In addition, five replicates of negative (uncontaminated) samples were prepared for the swab matrix. All samples

were tested in duplicate by two different analysts on different days by qPCR. Positive and negative (no template) control were tested in each run. Nuclease-free water, (DEPC-treated, molecular biology grade, CAS 7732-18-5) was used as a template in negative control reactions.

Results

PCR Efficiency: The qPCR efficiency of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* was found to be 98.5% and 98.6%, respectively. The data of the qPCR efficiency tests are given in Table 2.

Specificity: The wet tests showed that the kit does not cross-react with the other strains of the *Mycoplasma* genus or the strains of other microorganisms. In addition, all inclusivity test strains were positive by qPCR (Table 3).

Table 2. Data of PCR efficiency tests.

Target	Dilution Factor	Cq1	Cq2	Cq mean	Cq difference ^[a] (between previous dilution)
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	1/2	18.32	18.39	18.35	-
	1/4	20.23	20.29	20.26	1.91
	1/16	22.29	22.33	22.306	2.046
	1/64	24.28	24.62	24.445	2.139
	1/256	26.67	26.69	26.68	2.235
	1/1024	28.62	28.71	28.654	1.974
<i>Mycoplasma synoviae</i>	1/2	18.29	18.30	18.3	-
	1/4	20.15	20.37	20.266	1.966
	1/16	22.36	22.38	22.39	2.124
	1/64	24.32	24.35	24.33	1.94
	1/256	26.8	26.85	26.825	2.495
	1/1024	28.75	28.78	28.775	1.95

^[a] As the DNA is diluted 4-fold in each dilution, the expected Cq difference with the previous dilution is 2.0 when the PCR efficiency is 100% ($4=2^2$).

Table 3. Selectivity test results of multiplex qPCR with MG/MS and other strains.

Species/Strain ^[a]	Source ^[b]	Ip	vlhA	IC	Species/Strain ^[a]	Source ^[b]	Ip	vlhA	IC
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>					<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>				
serovar Enteritidis (1)	AUVFM	-	-	+	<i>Avibacterium paragallinarum</i> (1)	AUVFM	-	-	+
serovar Kentucky (1)	AUVFM	-	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	AUVFM	-	-	+
serovar Infantis (1)	AUVFM	-	-	+	<i>Staphylococcus aureus</i> (1)	AUVFM	-	-	+
serovar Mbandaka (1)	AUVFM	-	-	+	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> (1)	AUVFM	+	-	+
serovar Virchow (1)	AUVFM	-	-	+	<i>Mycoplasma synoviae</i> (1)	AUVFM	-	+	+
serovar Liverpool (1)	AUVFM	-	-	+	<i>Mycoplasma iowae</i> (1)	AUVFM	-	-	+
serovar Agona (1)	AUVFM	-	-	+	<i>Mycoplasma meleagridis</i> (1)	AUVFM	-	-	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (1)	AUVFM	-	-	+					
<i>Escherichia coli</i> (1)	AUVFM	-	-	+					
<i>Pasteurella multocida</i> (1)	AUVFM	-	-	+					

^[a] The numbers in parentheses indicate the number of strains.

^[b] AUVFM refers to Ankara University Faculty of Veterinary Medicine Department of Microbiology.

Limit of detection (LOD): The detection limit of the assays was determined to be $<10^1$ DNA/ μ l from artificially contaminated swab samples. All negative and positive controls tested in the multiplex qPCR runs were eligible.

Discussion

The qPCR method developed in this study detecting the presence of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* is essential since these bacteria cause loss of productivity and economic losses in the poultry industry. Although the culture of the *Mycoplasma* species is considered as the gold standard method for the detection of avian *Mycoplasma* species, these methods are time-consuming, labour-intensive, and fastidious (Kleven et al. 1991; Nascimento et al. 1991; Mekkes and Feberwee 2005). For this reason, PCR-based methods have been replaced culture methods for more than a decade (Marois et al. 2002; Mekkes and Feberwee 2005; Fraga et al. 2013; Khalifa et al. 2013; Fujisawa et al. 2019). In this study, the development of a rapid, sensitive and effective method for the detection of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* from poultry samples was aimed. Analysis of the qPCR assay resulted in 100% identity for the primer and probe sequences targeting *M. gallisepticum* and *M. synoviae*.

Since the 16S ribosomal DNA (rDNA) gene sequences are highly conserved within the bacteria, for the diagnosis of MG and MS by PCR methods, the 16S rRNA gene was targeted in the early 1990s (Lauerman 1998). However, PCR assays targeted 16S rDNA gene might cross-react with other bacterial species and cause false-negative results (Kempf 1998). Because of this reason we choose PCR primers based on the *lp* gene and *vlhA* gene for detection of MG and MS, respectively (Nascimento et al. 1991; Noormohammadi et al. 2000; Bencina et al. 2001; Carli and Eyigor 2003). The *mgc2* gene of MG and the *vlhA* gene of MS are widely used for the detection of avian *Mycoplasma* species according to World Organization of Animal Health (OIE). The PCR method targeted to the MG *lp* gene was first described by Nascimento et al. (Nascimento et al. 1991). The *lp* gene was investigated with the *gapA* gene together by nested PCR method by Nascimento et al. Carli and Eyigor (2003) first described the method for the detection of MG in chicken tracheal samples by using qPCR and DNA melting curve analysis. One advantage of the developed method in this study is that targeted the *lp* gene is a single PCR method. For the detection of MS, the *vlhA* gene

is already recommended in several studies (Hong et al. 2004; Moscoso et al. 2004; Ghaniei 2016; Fujisawa et al. 2019; Felice et al. 2020).

The detection limit of the assay in this study was found $<10^1$ DNA/ μ l from artificially contaminated swab samples. Other studies reported the detection limits in colony-forming units (CFU) and color changing-units (CCU). Carli and Eyigor (2003) reported the value of the LOD assay as 3000 CFU/ ml^{-1} for MG. Hong et al. (2004) determined the LOD of the *vlhA* PCR assay as 4.7×10^2 CCU/ml. In this context, a direct comparison of detection limits between the studies cannot be made.

The data presented in this study indicate that this qPCR procedure based on the *vlhA* and *lp* genes of *M. synoviae* and *M. gallisepticum* has the favorable sensitivity and specificity required to be useful as a diagnostic PCR. Beside this, the cost of qPCR can be reduced by pooling samples (Khalifa et al. 2013). At present, this developed method has been used in Turkey for the detection of MG and MS in some commercial poultry flocks.

Ethic statement: This study does not present any ethical concerns.

Conflict of Interest Statement: The authors declare no conflicts of interest with respect to the publication of this manuscript. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- Bencina D, Drobnic-Valic M, Horvat S, Narat M, Kleven SH, Dovc P (2001) Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. *FEMS Microbiol Lett.* 203(1), 115-23. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10829.x
- Callison SA, Riblet SM, Sun S, Ikuta N, Hilt D, Leiting V, Kleven SH, Suarez DL, Garcia M (2006) Development and validation of a real-time Taqman polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* in naturally infected birds. *Avian Dis.* 50(4), 537-44. DOI: 10.1637/7639-050106R.1
- Carli KT, Eyigor A (2003) Real-time polymerase chain reaction for *Mycoplasma gallisepticum* in chicken trachea. *Avian Dis.* 47(3), 712-7. DOI: 10.1637/6041
- Felice V, Lupini C, Mescolini G, Silveira F, Guerrini A, Catelli E, Di Francesco A (2020) Molecular detection and characterization of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* strains in backyard poultry in Italy. *Poult Sci.* 99(2), 719-724. DOI: 10.1016/j.psj.2019.12.020
- Fraga AP, de Vargas T, Ikuta N, Fonseca AS, Celmer AJ, Marques EK, Lunge VR (2013) A Multiplex real-time PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from Brazilian commercial poultry flocks. *Braz J Microbiol.* 44(2), 505-10. DOI: 10.1590/S1517-83822013000200028

- Fujisawa S, Murata S, Takehara M, Katakura K, Hmoon MM, Win SY, Ohashi K (2019) Molecular detection and genetic characterization of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, and infectious bronchitis virus in poultry in Myanmar. *BMC Vet Res.* 15(1), 261. DOI: 10.1186/s12917-019-2018-2
- Ghaniei A (2016) Molecular characterization of *Mycoplasma synoviae* isolated from broiler chickens of West Azarbaijan province by PCR of *vlhA* gene. *Vet Res Forum.* 7(3), 197-202.
- Grodio JL, Dhondt KV, O'Connell PH, Schat KA (2008) Detection and quantification of *Mycoplasma gallisepticum* genome load in conjunctival samples of experimentally infected house finches (*Carpodacus mexicanus*) using real-time polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 37(4), 385-91. DOI: 10.1080/03079450802216629
- Hess M, Neubauer C, Hackl R (2007) Interlaboratory comparison of ability to detect nucleic acid of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 36(2), 127-33. DOI: 10.1080/03079450701203082
- Hong Y, Garcia M, Leiting V, Bencina D, Dufour-Zavala L, Zavala G, Kleven SH (2004) Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. *Avian Dis.* 48(3), 606-16. DOI: 10.1637/7156-011504R
- Kempf I (1998) DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Avian Pathol.* 27(1), 7-14. DOI: 10.1080/03079459808419268
- Kleven SH, Rowland CN, Olson NO. (1991) *Mycoplasma synoviae* infection. Calnek BW, Beard CW, Barnes HJ, Reid WM, Yoder Jr HW. eds. *Diseases of Poultry.* Iowa State press, Iowa. p. 223-231.
- Khalifa KA, Sidahmed Abdelrahim E, Badwi M, Mohamed AM (2013) Isolation and Molecular Characterization of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in Chickens in Sudan. *J Vet Med.* 2013, 208026. DOI: 10.1155/2013/208026
- Lauerman LH (1998) *Mycoplasma* PCR assays. Lauerman LH. eds. *Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases.* Turckcock CA. p. 41-42.
- Ley DH. (2003) *Mycoplasma gallisepticum* infection. Saif YM, Barends HJ, Glisson JR, McDougald LR, Swayne DE. eds. *Diseases of Poultry.* Iowa State press, Iowa. p. 722-744.
- Lockaby SB, Hoerr FJ, Lauerman LH, Smith BF, Samoylov AM, Toivio-Kinnucan MA, Kleven SH (1999) Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 43(2), 251-61.
- Marois C, Dufour-Gesbert F, Kempf I (2002) Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in environmental samples. *Avian Pathol.* 31(2), 163-8. DOI: 10.1080/03079450120118658
- Mekkes DR, Feberwee A (2005) Real-time polymerase chain reaction for the qualitative and quantitative detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Pathol.* 34(4), 348-54. DOI: 10.1080/03079450500179954
- Moscoso H, Thayer SG, Hofacre CL, Kleven SH (2004) Inactivation, storage, and PCR detection of *Mycoplasma* on FTA filter paper. *Avian Dis.* 48(4), 841-50. DOI: 10.1637/7215-060104
- Nascimento ER, Yamamoto R, Herrick KR, Tait RC (1991) Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 35(1), 62-9.
- Noormohammadi AH, Markham PF, Kanci A, Whithear KG, Browning GF (2000) A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. *Mol Microbiol.* 35(4), 911-23. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01766.x
- Raviv Z, Callison SA, Ferguson-Noel N, Laibinis V, Wooten R, Kleven SH (2007) The *Mycoplasma gallisepticum* 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence as a novel tool for epizootological studies. *Avian Dis.* 51(2), 555-560.
- Yoder Jr HW (1991). *Mycoplasma gallisepticum* infection. Calnek BW, Beard CW, Barnes HJ, Reid WM, Yoder Jr HW. eds. *Diseases of Poultry.* Iowa State press, Iowa. p. 198-212.



Türkiye’de Doğu Akdeniz illerindeki süt keçisi işletmelerinde pestivirus enfeksiyonlarının seroprevalansı

Fırat Doğan^{1*}, Veyssel Soydal Ataseven², Yaşar Ergün³

^{1,2}Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye.

³Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye.

Geliş Tarihi / Received: 15.03.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 03.05.2021

Özet: Pestiviruslar, konak genişlikleri, multisistemik hastalık tablosuna ve yüksek ekonomik kayıplara yol açmaları nedeniyle çiftlik hayvanlarının en önemli viral patojenleri arasında yer almaktadır. Pestiviruslar konakçı spesifik olmadıkları gibi tanımlanmış tüm pestiviruslar sığır, koyun, keçi, alpaka, geyik ve domuzlarda çoğalabilmektedir. Persiste bovine viral diarrhoea virus (BVDV) ve border disease virus (BDV) enfeksiyonları keçilerde nadir olarak bildirilmesine karşın, akut enfeksiyon modeli şeklinde gebe keçilerde abortlar ve oğlaklarda merkezi sinir sistemi bulguları ile karakterize olgular rapor edilmiştir. Bu çalışmada, Akdeniz bölgesinin doğusunda yer alan 3 ildeki (Kahramanmaraş, Hatay ve Osmaniye) keçi popülasyonunda pestivirus enfeksiyonunun seroprevalansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı ırk keçilerden alınan 461 kan serumu örneği kullanıldı ve ELISA ile antikor varlığı araştırıldı. Örneklenen keçi popülasyonundaki toplam seroprevalansın %16,7 (77/461) olduğu saptandı. Ayrıca ırklar arasındaki seropozitiflik istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Sonuç olarak, bu çalışmada Türkiye’nin Doğu Akdeniz alanında örnekleme yapılan Kahramanmaraş, Osmaniye ve Hatay illerindeki farklı ırklardan keçi sürülerinde pestivirus sirkülasyonu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Antikor, Doğu Akdeniz, ELISA, keçi, pestivirus.

Seroprevalance of pestivirus infections in dairy goat farms in Eastern Mediterranean, Turkey

Abstract: Pestiviruses are among the most important viral pathogens of livestock due to their host size, multisystemic disease and high economic losses. Pestiviruses are not host specific, and all identified pestiviruses can reproduce in cattle, sheep, goats, alpaca, deer and pigs. Although persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and border disease virus (BDV) infections are rarely reported in goats, cases characterized by abortions in pregnant goats and central nervous system findings in goats have been reported as an acute infection model. In this study, it was aimed to evaluate the seroprevalence of pestivirus infection in the goat population in 3 provinces (Kahramanmaraş, Hatay and Osmaniye) located in the east of the Mediterranean region. For this purpose, 461 blood serum samples were used taken from different breed goats and the presence of antibodies was investigated by ELISA. The total seroprevalence in the sampled goat population was found to be 16.7% (77/461). In addition, seropositivity between races was found to be statistically significant. In conclusion, this study conducted sampling in the Eastern Mediterranean area of Turkey Kahramanmaraş, Osmaniye and pestivirus circulation in a lot of different races in the province of Hatay shown goats.

Keywords: Antibody, Eastern Mediterranean, ELISA, goat, pestivirus.

Giriş

Pestiviruslar, konak genişlikleri, multisistemik hastalık tablosuna ve yüksek ekonomik kayıplara yol açmaları nedeniyle çiftlik hayvanlarının en önemli viral patojenleri arasında yer almaktadır (Baker 1995; Cironne ve ark. 2018). Sığırlardaki bovine viral diarrhoea virus (BVDV1; BVDV2; HoBi-like: BVDV3), domuzlardaki klasik domuz vebası virusu, koyun ve keçilerdeki border disease virusları (BDV1-7); RNA genomuna sahip *Flaviviridae* ailesinin *Pestivirus* cinsi içinde sınıflandırılmıştır (ICTV 2020). Pestivi-

ruslar konakçı spesifik olmadıkları gibi tanımlanmış tüm pestiviruslar sığır, koyun, keçi, alpaka, geyik ve domuzlarda çoğalabilmektedir (Terpstra ve Wensvoort 1997; Carman ve ark. 2005; Nelson ve ark. 2008; Broaddus ve ark. 2009; Oğuzoğlu ve ark. 2009). Persiste BVDV ve BDV enfeksiyonları keçilerde nadir olarak bildirilmesine karşın, akut enfeksiyon modeli şeklinde gebe keçilerde abortlar ve oğlaklarda merkezi sinir sistemi bulguları ile karakterize olgular rapor edilmiştir (Broaddus ve ark. 2009; Abdel-Latif ve ark. 2013; Schweizer ve Peterhans 2014).

Yazışma adresi / Correspondence: Fırat Doğan, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Hatay E-posta: firat9837@gmail.com

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0001-8656-3645 • ²0000-0003-0802-0826 • ³0000-0002-1414-9100

Pestivirus enfeksiyonlarıyla mücadele programları, sürüdeki aktif enfeksiyonların izlenmesi, persiste enfekte hayvanların sürüden çıkarılması, aşılama, sürveyans ve biyogüvenlik önlemlerini içermektedir (Houe ve ark. 2006; Newcomer ve ark. 2017). Bu amaçla, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve antijen ELISA gibi virolojik yöntemler tanıda başarılı bir şekilde kullanılmasına rağmen bu metodların klinik örneklerde virus varlığını gerektirmesi gibi dezavantajları vardır. Keçilerde persiste enfeksiyonun nadir olması ve kısa süreli akut enfeksiyonlarla daha sık karşılaşılması nedeniyle özellikle geniş zaman dilimindeki epidemiyolojik verilerin değerlendirilebilmesi ve mücadele programlarının ortaya konulmasında serolojik araştırmalar daha uygun bir yaklaşım olarak önerilmektedir (Schweizer ve Peterhans 2014; Cirone ve ark. 2018). Türkiye’de sığır ve koyunlarda pestivirus enfeksiyonlarına karşı çok sayıda seroepidemiolojik araştırma bulunmasına rağmen (Burgu ve ark. 1984; Çabalar ve Karaoğlu 1999; Burgu ve ark. 2003; Yıldırım ve Burgu 2005; Okur-Gümüşova ve ark. 2006; Tan ve ark. 2006; Gür 2009; Azkur ve ark. 2011; Yıldırım ve ark. 2011; Yılmaz 2016), keçilerde sınırlı sayıda (Ataseven ve ark. 2006; Gür ve ark. 2009; Ural ve Erol 2017; Alpay ve ark. 2018).

Bu araştırmada, Türkiye’de dondurma, peynir ve tuzlu yoğurt gibi geleneksel gastronomi kültüründe önemli yeri olan keçi sütü üretiminin yoğun olarak yapıldığı Akdeniz bölgesinin doğusunda yer alan 3 ildeki (Kahramanmaraş, Hatay ve Osmaniye) keçi popülasyonunda pestivirus enfeksiyonunun seroprevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Serum Örnekleri

Araştırma, 2017-2019 yılları arasında Doğu Akdeniz bölgesinde Kahramanmaraş’ta Saanen ırkı, Osmaniye’de Kıl keçisi ve Saanen ırkı, Hatay’da küçük ölçekli Halep (Damascus) ırkı keçi yetiştiriciliğinin yapıldığı 10 süt keçisi işletmesinden bir yaş üzeri ve söz konusu enfeksiyona karşı aşısız, toplam 461 sağlıklı görü-

nümlü keçiden laboratuvara gönderilen kan serumu örneklerinde gerçekleştirildi (Tablo 1).

Kahramanmaraş’taki 1 nolu işletme dışında diğer işletmeler dışardan nadiren hayvan girişi olan ve mera yayılımı yapılan küçük ölçekli aile işletmeleriydi. Kahramanmaraş’taki 1 nolu işletme ise aralıklarla Türkiye’nin farklı yerlerinden hayvan girişlerinin olduğu büyük ölçekli ticari bir işletmeydi. Bu işletmedeki hayvanların %25’i, küçük işletmelerdeki keçilerin ise tamamı örneklendi.

İndirek ELISA

Çalışmada, pestivirus anti-NS2-3 antikorlarının tespiti için ticari bir BVDV/BDV p80 antikor ELISA kiti (CIVTEST Bovis, Hipra Lab., İspanya) kullanıldı. Test üretici firmanın önerileri doğrultusunda serumlar 1/10 oranında sulandırılarak gerçekleştirildi. Tüm sonuçlar ELISA okuyucu (Mindray MR-96A, Almanya) kullanılarak spektrofotometrik olarak 450 nm absorpsiyon dalga boyunda değerlendirildi.

İstatistik

Tanımlayıcı istatistikler frekans ve yüzde şeklinde gösterildi. İrklara göre serolojik durumun değişimi Pearson Ki-Kare Testi ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edildi. İstatistiksel analizler Stata/SE 15.1 paket programı kullanılarak yapıldı.

Bulgular

Bu araştırmada, örneklenen keçi popülasyonunda pestivirus enfeksiyonunun seroprevalansının %16,7 (77/461) olduğu saptandı (Tablo 1).

İllere göre toplam pestivirus seropozitiflik düzeyi yüksekten düşüğe sırasıyla Hatay (%25,3), Kahramanmaraş (%16,8) ve Osmaniye’de (%6,8) belirlendi (Tablo 1). Ayrıca her ildeki işletmelere göre seropozitiflik oranları Hatay’da %3,3-62,5; Kahramanmaraş’ta %2,1-20,1 ve Osmaniye’de %2,2-11,4, arasında dağılım gösterdiği tespit edildi (Tablo 2).

Tablo 1. İllere göre örneklenen hayvan sayıları ve pestivirus enfeksiyonu seropozitiflik oranları.

İller	Hatay n:150	Kahramanmaraş n:179	Osmaniye n:132	Toplam n:461	
Seropozitivite % (n)	Antikor (+) 25,3 (38/150)	Antikor (+) 16,8 (30/179)	Antikor (+) 6,8 (9/132)	Antikor (+) 16,7 (77/461)	Antikor (-) 83,3 (384/461)

Tablo 2. illere ve işletmelere göre örneklenen hayvan sayıları ve pestivirus enfeksiyonu seropozitiflik oranları.

İşletme No.	1	2	3	4	5
	Antikor (+) % (n)	Antikor (+) % (n)	Antikor (+) % (n)	Antikor (+) % (n)	Antikor (+) % (n)
Hatay (Toplam n: 150)	62,5 (20/32)	35 (7/20)	13,3 (4/30)	15,8 (6/38)	3,3 (1/30)
Osmaniye (Toplam n:132)	11,4 (5/44)	2,2 (1/45)	7,0 (3/43)		
Kahramanmaraş (Toplam n:179)	20,1 (29/144)	2,1 (1/47)			

İrklara göre elde edilen seropozitiflik oranı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,004$). Pestivirusunun Damascus irkında serolojik olarak pozitif görülme oranı (%25,3), Saanen ve Kıl keçilerinde pozitif görülme oranlarından (sırasıyla %12,7 ve %11,4) daha yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 3).

Tablo 3. İrklara göre pestivirus enfeksiyonu seropozitifliğinin istatistiki değerlendirmesi.

	n (%)			p
	Pozitif	Negatif	Toplam	
Damascus	38 (%25,3)	112 (%74,7)	150	0,004
Saanen	34 (%12,7)	233 (%87,3)	267	
Kıl Keçisi	5 (%11,4)	39 (%88,6)	44	
Toplam	77 (%16,7)	384 (%83,3)	461	

Tartışma ve Sonuç

İki bin on dokuz yılı TÜİK verilerine göre Türkiye’de toplam süt üretiminin yaklaşık %2,5’ini karşılayan 12 milyonu aşan bir keçi popülasyonu bulunmaktadır (ESK 2019; TÜİK 2020). Türkiye’de keçi yetiştiriciliği işletmeleri genelde küçük ölçekli olarak yürütülmesine rağmen ekonomik, ekolojik ve sosyolojik olarak göz ardı edilemeyecek bir konumdadır (Günlü ve Alaşahan 2010). Diğer tüm ruminantlarda olduğu gibi bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) ve parainfluenzavirus-3 (PIV-3) viral enfeksiyonlarına duyarlı olduğu bildirilen keçilerde pestiviruslar da postnatal veya konjenital enfeksiyonlar neticesinde ağır ekonomik kayıplara yol açtıkları için yetiştiricilik yönünden önem taşımaktadır (Ataseven ve ark. 2006; Ataseven ve ark. 2010; Cirone ve ark. 2018). Ayrıca, sığırlar ve küçük ruminantlar arasında çapraz bulaşmanın varlığı ve enfeksiyonun akut ya da persiste enfekte hayvanlarda asemptomatik görülebilmesinden dolayı etkili bir pestivirus kontrol programının başarılı olabilmesi için eradikasyon/eliminasyon programlarında yer alan sörveyans uygulamalarına küçük ruminantların da eklenmesi gerektiği bildirilmiştir (Baker 1995; Broaddus ve ark. 2009; Cirone ve ark. 2018).

Dünyada farklı ırklardan keçi popülasyonlarında yapılan çalışmalarda pestivirus seropozitifliği %1,5-31,3 oranları arasında belirlenmiştir (Krametter-Frötscher ve ark. 2006; Oem ve ark. 2012; Ali ve ark. 2013; Cirone ve ark. 2018). Türkiye’de koyunlarda %90,27 oranında dünyadaki en yüksek antikor prevalansı rapor edilmesine karşın (Ozan ve ark. 2012), keçilerde %3,17-78,8 arasında değişen seroprevalans oranları bildirilmiştir (Ataseven ve ark. 2006; Gür ve ark. 2009; Ural ve Erol 2017; Alpay ve ark. 2018). Bu çalışmada, örneklenen keçi popülasyonundaki toplam seroprevalansın %16,7 (77/461) olduğu saptandı (Tablo 1).

Türkiye’de keçilerde bildirilen seropozitiflik oranları, enfeksiyonun ülkemizdeki yaygınlığının sığır ve koyunlara nazaran daha düşük düzeyde olduğunu göstermektedir. Ayrıca, persiste enfeksiyon prevalansının çok düşük olduğu keçiler pestiviruslar için etkili bir konak olarak tanımlanmamaktadır (Broaddus ve ark. 2009; Cirone ve ark. 2018).

Araştırmanın yürütüldüğü bölgedeki illere göre de pestivirus enfeksiyonu seropozitifliğinin %6,8-25,3 oranları arasında olduğu tespit edildi (Tablo 1). Örnekleme yapılan illerde işletmelere göre seropozitiflik oranları Hatay’da %3,3-62,5, Kahramanmaraş’ta %2,1-20,1 ve Osmaniye’de %2,2-11,4 arasında dağılım gösterdiği belirlendi (Tablo 2).

Keçilerdeki seroprevalans oranlarının; örnekleme zamanı, örneklenen hayvanların yaşı ve sayısı, bireysel ve genetik farklılıklar, aynı işletmede sığırlarla birlikte yetiştirme, ortak mera kullanımı ve bakım-besleme özellikleri, çiftlik yapısı gibi faktörlerden etkilenebileceği, ayrıca keçilerde pestivirus enfeksiyonlarının yavaş yayılımının da düşük prevalans oranlarıyla ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Cirone ve ark. 2018). Bu çalışmada, örneklenen işletmelerde sadece keçi yetiştirildiği için sığır veya koyunlardan direk temasla pestivirus bulaşma ihtimali söz konusu değildir. Ancak Hatay ve Osmaniye’deki küçük ölçekli işletmelerdeki seropozitifliğin ortak mera kullanımından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Kahramanmaraş'ta 1 nolu işletmedeki antikor prevalansı ise yoğun hayvan girişinden kaynaklı olabilir.

Birçok viral ve bakteriyel hastalıkta ırk predispozisyonu olduğu belirtilmektedir (Azkur ve ark. 2011; Yaman ve ark. 2019; Taşkaya ve Kale 2020). Türkiye'de pestivirus yönünden koyunlarda ırk yatkınlığı ile ilgili bildirimler (Azkur ve ark. 2011) bulunmasına rağmen keçilerde bu konuyla ilgili yapılan çalışmaya rastlanılmamıştır. Yaptığımız bu çalışmada ırklara göre elde edilen seropozitiflik oranı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,004$). Pestivirusunun Damascus ırkında serolojik olarak pozitif görülme oranı (%25,3), Saanen ve Kıl keçilerinde seropozitif görülme oranlarından (sırasıyla %12,7 ve %11,4) daha yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 3).

Bu verilere göre keçi işletmelerinde; hayvan sağlığı, coğrafi koşullar ve ekonomik veriler de göz önünde bulundurularak ırk seleksiyonu yapılması ile söz konusu bu hastalığın sürülerde sirkülasyonunun azaltılabileceği böylece koruma ve kontrol önlemlerine de fayda sağlayabileceği düşünüldü. Özellikle bu hastalığa daha az duyarlı Saanen ve Kıl keçisi yetiştiriciliğinin desteklenmesi önerilebilir. Ancak ırk duyarlılıkları ile ilgili daha geniş kapsamlı çalışmaların yanı sıra deneysel çalışmaların da yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Türkiye'nin Doğu Akdeniz bölgesinde örneklemeye yapılan Kahramanmaraş, Osmaniye ve Hatay illerindeki farklı ırklardan keçi sürülerinde pestivirus sirkülasyonu gösterilmiştir. Türler arası çapraz bulaşma ve persistens gibi epidemiyolojik özellikleri ve keçilerde BDV enfeksiyonuna karşı ticari BVDV aşılılarıyla düşük düzeyli korunma sağlanabilmesi keçi yetiştiriciliği işletmelerinde pestivirus sirkülasyonunun azaltılması için etkili kontrol önlemlerinin uygulanmasını gerektirmektedir. Ayrıca ırk duyarlılıkları ile ilgili daha geniş kapsamlı ve deneysel çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır.

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler: Bu çalışma için Deney Havanları Etik kurulu iznine gerek yoktur.

Teşekkür: Bu çalışmanın istatistiksel analizlerinin yapılmasında emeği geçen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim elemanı Araş. Gör. Dr. Kadriye Pınar AMBARCIOĞLU'na teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Abdel-Latif AO, Goyal SM, Chander Y, Abdel-Moneim AS, Tamam SM, Madbouly HM. (2013) Isolation and molecular characterisation of a pestivirus from goats in Egypt. *Acta Vet Hung.* 61(2),270-280.
- Ali YH, İntisar KS, Ishag OM, Baraa AM, Haj MA, Taha KM, Tama-dor MA, Hussien MO, Elfahal AM. (2013) Seroprevalence of pestivirus in small ruminants in Sudan. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7(31), 3988-3991.
- Alpay G, Öner EB, Yeşilbağ K. (2018) Seroepidemiology and molecular investigation of pestiviruses among sheep and goats in Northwest Anatolia. *Turk J Vet Anim Sci.* 42, 205-210.
- Ataseven VS, Ataseven L, Tan MT, Babür C, Oğuzoğlu TÇ. (2006) Seropositivity of agents causing abortion in local goat breeds in Eastern and South-Eastern Anatolia. *Rev Med Vet.* 157 (11), 545-550.
- Ataseven VS, Başaran Z, Yılmaz V, Bilge-Dağalp S. (2010) Van Bölgesi Keçilerinde Parainfluenza Virus-3 (PIV-3) ve Bovine Herpes Virus-1 (BHV-1) Enfeksiyonlarının Seroprevalansı. *Yüzüncü Yıl Üniv Vet Fak Derg.* 21 (1), 7-9.
- Azkur AK, Gazyağcı S, Aslan ME, Ünal N. (2011) Molecular and serological characterization of pestivirus infection among sheep in Kırıkkale Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 17 (Ek A), 83-92.
- Baker JC. (1995) The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11, 425-445.
- Broadbudd CC, Lamm CG, Kapil S, Dawson L, Holyoak GR. (2009) Bovine viral diarrhoea virus abortion in goats housed with persistently infected cattle. *Vet Pathol.* 46, 45-53.
- Burgu İ, Öztürk F, Akça Y. (1984) Tahirova devlet üretme çiftliği koyunlarında viral enfeksiyonlar üzerinde serolojik araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 31 (2), 167-179.
- Burgu İ, Akça Y, Alkan F, Özkul A, Karaoğlu T, Bilge-Dağalp S, Oğuzoğlu TÇ, Yeşilbağ K. (2001) The serological and virological investigations and pathogenesis of BVDV infection in sheep during pre- and post-partum periods. *Turk J Vet Anim Sci.* 25, 551-558.
- Burgu İ, Alkan F, Özkul A, Yeşilbağ K, Karaoğlu MT, Güngör B. (2003) Türkiye'de süt sığırcılığı işletmelerinde bovine viral diarrhoea virus (BVDV) enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve kontrolü. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 50, 127-133.
- Carman S, Carr N, DeLay J, Baxi M, Deregt D, Hazlett M. (2005) Bovine viral diarrhoea virus in alpaca: abortion and persistent infection. *J Vet Diagn Invest.* 17, 589-593.
- Cirone F, Cirone S, Trerotoli P, Buono R, Ciappetta G, Di Summa A, Gaggiano G, Pratelli A. (2018) Cross sectional study for pestivirus infection in goats in southern Italy. *Small Rum Res.* 166, 12-16.
- Çabalar M, Karaoğlu MT. (1999) Sığırlarda bovine viral diarrhoea (BVD) virus enfeksiyonuna karşı antikor varlığının araştırılmasında nötralizasyon immunperoksidaz (NPLA) ve serum nötralizasyon (SN) testlerinin karşılaştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 46, 249-255.
- Et ve Süt Kurumu (ESK). (2019) Hayvansal Üretim İstatistikleri. <https://www.esk.gov.tr/tr/14055/Yeni-TUIK-Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-2019>. Erişim: 21.12.2020.
- Günlü A, Alaşahan S. (2010) Türkiye'de Keçi Yetiştiriciliği ve Geleceği Üzerine Bazı Değerlendirmeler. *Vet Hekim Der Derg.* 81(2), 15-20.
- Gür S. (2009) An investigation of border disease virus in sheep in Western Turkey. *Trop Anim Health Prod.* 41, 1409-1412.

- Gür S, Erol N, Yapıcı O. (2009) Afyon, Konya ve Eskişehir illerinde keçilerde pestivirus ve parainfluenzavirus tip 3 enfeksiyonlarının serolojik olarak araştırılması. *Kocatepe Vet J.* 2 (1), 23-27.
- Houe H, Lindberg A, Moennig V. (2006) Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest.* 18(5), 427-436.
- ICTV Reports. (2020) Flaviviridae-Genus: Pestivirus. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/361/genus-pestivirus, Erişim tarihi: 08.08.2020.
- Krametter-Frötscher R, Loitsch A, Kohler H, Schleiner A, Schiefer P, Moestl K, Golja F, Baumgartner W. (2006) Prevalence of antibodies to pestiviruses in goats in Austria. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 48-50.
- Nelson DD, Dark MJ, Bradway DS, Ridpath JF, Call N, Haruna J, Rurangirwa FR, Evermann JF. (2008) Evidence for persistent Bovine viral diarrhoea virus infection in a captive mountain goat (*Oreamnos americanus*). *J Vet Diagn Invest.* 20, 752-759.
- Newcomer BW, Chamorro MF, Walz PH. (2017) Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol.* 206, 78-83.
- Oem J, Lee E, Byun J, Kim H, Kwak D, Song H, Jung B. (2012) Serological and virological investigation of pestiviruses in Korean black goats. *Korean J Vet Service.* 35(2), 129-131.
- Oğuzoğlu TÇ, Tan MT, Toplu N, Demir AB, Bilge-Dağalp S, Karaoğlu T, Özkul A, Alkan F, Burgu İ, Haas L, Greiser-Wilke I. (2009) Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: a new BDV subgroup? *Vet Microbiol.* 135, 374-379.
- Okur-Gümüşova S, Yazıcı Z, Albayrak H. (2006) Pestivirus seroprevalence in sheep populations from inland and coastal zones of Turkey. *Rev Med Vet.* 157, 595-598.
- Ozan E, Turan HM, Albayrak H, Çavut A. (2012) Serological Determination of Pestivirus, Bluetongue Virus and Peste Des Petits Ruminants Virus in Small Ruminants in Samsun Province of Turkey. *Atatürk Üni. Vet. Bil. Derg.* 7(1), 27-33.
- Schweizer M, Peterhans E. (2014) Pestiviruses. *Annu Rev Anim Biosci.* 2, 141-163.
- Tan MT, Karaoğlu MT, Erol N, Yıldırım Y. (2006) Serological and virological investigations of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) infection in dairy cattle herds in Aydın province. *Turk J Vet Anim Sci.* 30 (3), 299-304.
- Taşkaya H, Kale M. (2020) Honamlı keçi ırkında Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) enfeksiyonunun araştırılması *MAKU Vet Fak Derg.* 5 (2), 58-63.
- Terpstra C, Wensvoort G. (1997) A congenital persistent infection of bovine virus diarrhoea virus in pigs: clinical, virological and immunological observations. *Vet Q.* 19,97-101.
- Timurcan MÖ, Aydın H. (2019) Increased genetic diversity of BVDV strains circulating in Eastern Anatolia, Turkey: first detection of BVDV-3 in Turkey. *Trop Anim Health Prod.* 51 (7), 1953-61.
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu). (2020) Hayvansal Üretim İstatistikleri, Haziran 2020. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Animal-Production-Statistics-June-2020-33874>, Erişim tarihi: 21.12.2020.
- Ural ZE, Erol N. (2017) Aydın ve İzmir illerindeki Koyun ve Keçilerde Pestivirus Enfeksiyonunun Serolojik ve Virolojik Olarak Araştırılması. *Harran Üniv Vet Fak Derg.* 6 (1), 63-68.
- Yaman Y, Keleş M, Aymaz R, Sevim S, Sezenler T, Önalı AT, Heaton MP. (2019) Association of TMEM154 variants with visna/maedi virus infection in Turkish sheep. *Small Ruminant Research*, 177, 61-67.
- Yıldırım Y, Burgu İ. (2005) Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi'ndeki sığırlarda mavidil (BT), IBR, PI-3, EBL ve BVD enfeksiyonlarının seroprevalansı. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 52, 113-117.
- Yıldırım Y, Yılmaz V, Kalaycıoğlu AT, Dağalp SB, Majarashin Faraji AR, Celebi O, Akca D. (2011) An investigation of a possible involvement of BVDV, BHV-1 and BHV-4 infections in abortion of dairy cattle in Kars District of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 17, 879-883.
- Yılmaz V. (2016) Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in blood and milk serum in dairy cattle in Kars district of Turkey. *Indian J Anim Res.* 50(5), 811-815.



Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan süt örneklerinde bazı metal düzeyleri

Erdim Ozan Çakır^{1*}, Ender Yarsan²

¹ Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, İlaç Kalite Kontrol Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 22.02.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 03.05.2021

Özet: Süt, yaşamın her evresinde önemli bir besin kaynağıdır. Sütün bileşimi, kalıtsal, fizyolojik ve çevresel faktörler ile yetiştirme koşullarına bağlı olarak büyük ölçüde değişir. Günümüzde endüstrideki hızlı gelişmeye bağlı olarak ortaya çıkan çevre kirliliğinin olumsuz etkilerinden birisi de insan ve hayvanların ağır metallere maruz kalmasıdır. Sütün kontaminasyonu, insan ve hayvan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. Bu olası etkileri değerlendirmek amacıyla Marmara, Karadeniz, İç Anadolu, Doğu Anadolu, Akdeniz ve Ege bölgelerinden, 2007 yılında üçer aylık dört dönemde temin edilen numunelerde, sütün yapısında bulunan demir (Fe), bakır (Cu), çinko (Zn) yanında sütte bulunması muhtemel kurşun (Pb) ve kadmiyum (Cd) düzeyleri yönünden analizler yapıldı. Pb ve Cd analizleri Grafit Fırınlı Atomik Absorbsiyon Spektrometre (GF-AAS), Fe, Cu ve Zn analizleri ise Alevli Atomik Absorbsiyon Spektrometre (A-AAS) ile gerçekleştirildi. Pb yönünden örneklerin 10'unun (%8,3) maksimum kalıntı limitlerini aştığı, ancak genel ortalamanın bu değerin altında olduğu görüldü. Cd, Cu, Fe, ve Zn yönünden normal sınırlar içerisinde olduğu ve insan sağlığı yönünden risk oluşturacak düzeyde olmadığı tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Ağır metal, Atomik absorpsiyon spektrometre, süt, Türkiye

Some metal levels in milk samples which were collected from different regions of Turkey

Abstract: Milk is an important food source in every stage of life. The composition of milk varies greatly depending on the animal-source, hereditary, physiological and environmental factors and the husbandry conditions. Today, one of the negative effects of environmental pollution, which occurs due to the rapid development in industry, is the exposure of humans and animals to heavy metals. Milk contamination poses a threat to human and animal health. In order to assess these potential effects iron (Fe), copper (Cu) and zinc (Zn), which are generally found in the composition of the milk as well as possibly found lead (Pb) and cadmium (Cd) levels were analyzed in samples obtained from Marmara, Black Sea, Central Anatolia, Eastern Anatolia, Mediterranean and Aegean regions for four quarterly periods in 2007. Pb and Cd analyzes were performed with Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer (GF-AAS) and Fe, Cu and Zn analyzes were performed with Flamed Atomic Absorption Spectrometer (F-AAS). It was seen that 10 (8.3%) of the samples exceeded the maximum residue limits in terms of Pb, but the average was below this value. Cd, Cu, Fe, and Zn were found to be within normal limits and not to pose a risk for human health.

Keywords: Atomic absorption spectrometer, heavy metal, milk, Turkey

Giriş

Süt, geniş anlamda bütün memeli hayvanların yavru lamalarından sonra meme bezlerinde oluşturdukları biyolojik salgı olarak tanımlanır (Tekinşen 2000). Çiğ süt ise, bir veya daha fazla inek, keçi, koyun veya mandanın sağılmasıyla elde edilen, 40°C'nin üzerinde ısıtılmamış veya eşdeğer etkiye sahip herhangi bir işlem görmemiş kolostrum dışındaki meme bezi salgısıdır (Anon 2011a).

Sütün bileşimi ve elementer içeriği, önemli ölçüde farklılık gösterir. Değişimler başlıca, ineğin fizyolojisi (laktasyon dönemi, gebelik, yaş, meme sağlığı) ile kalıtım ve çevre faktörlerine, bir ölçüde

de sağım sırası, arası ve sonrası işlemlere bağlıdır (Tekinşen 2000).

Süt ve süt ürünleri beslenme açısından, oldukça önemli bir besin grubu olup, yaşamlarının her evresinde insanlar için gereklidir. Bu durumun temel sebebi; süt ve süt ürünlerinin çeşitli besin öğeleri açısından iyi bir kaynak olmalarıdır.

Günümüzde endüstrideki hızlı gelişmeye bağlı olarak ortaya çıkan çevre kirliliğinin olumsuz etkilerinden birisi de insan ve hayvanların solunum ve beslenme yoluyla ağır metallere maruz kalmasıdır. Her çevre sorununun kökeninde hava, su ve topraktan en az birinin doğal bileşiminin bozularak

kirlenmesi yatmaktadır. Özgül ağırlıkları 5 g ve bu değerler üzerinde olan metaller, ağır metal olarak nitelenmekte (Ag, As, Cd, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Zn gibi) ve bunların çok yönlü zararları neden oldukları bilinmektedir (Algan 2002; Özrenk 2002).

Canlı organizmada çeşitli biyokimyasal işlevlere sahip olan ve gıdalar aracılığıyla alınan demir (Fe), çinko (Zn) ve bakır (Cu) gibi elementler insan vücudu için gereklidir. Bununla birlikte tavsiye edilen miktar üzerindeki seviyeleri toksik hale gelebilir. Organizma için gerekli olmayan Kadmiyum (Cd) ve kurşun (Pb) gibi ağır metallerin ise bilinen biyolojik bir rolü yoktur, çok düşük konsantrasyonlarda toksik etkilere neden olabilir. Bu nedenle, gıdalar aracılığıyla ağır metallerle maruziyet, insan sağlığına tehdit oluşturmaktadır. Dekompozisyon için uygun olmamaları, parçalanmamaları, yaşam boyu maruziyet ve gıda zinciri aracılığıyla yüksek seviyede birikmeleri, ağır metalleri diğer bulaşanlardan ayırır (Boudebouz 2021).

Vücuda alınan kurşun, öncelikle hemoglobinin sentezini ALA-D (*delta- aminolevülinik asit dehidraz*) ve *hem sentetaz* enzimlerini inhibe ederek iki aşamada bloke eder. Anemiye sebep olur. Kurşun doğrudan alyuvarlarda parçalanmaya yol açar (Kaya ve Akar, 1998).

Kurşunun en önemli toksik zararlarından birisi de merkezi sinir sistemi üzerine olan etkisidir. Etkilenme nedeniyle özellikle çocuklarda zihinsel hasarlar, öğrenme yeteneğinde azalma ve davranış bozuklukları görülebilir (Özrenk 2002).

FAO/ WHO uzmanlar komitesi (JECFA) geçici tolere edilebilir haftalık alım miktarını 25 mg/L vücut ağırlığı olarak belirlemiştir. Kodeks Alimentarius Komisyonu (CAC) tarafından tavsiye edilen haftalık sınır ise, 0,05 mg/L vücut ağırlığıdır. Değişik analitik veriler dikkate alındığında sütteki normal kurşun miktarlarının 0.01–0.05 mg/L arasında değiştiği ifade edilebilir. Günde 1 litre ortalama seviyede kurşun içeren süt tüketildiğinde (ve / veya denk miktarda süt ürünleri), tolere edilebilir kurşun alınımında sütün etkisi %1'den az olmaktadır. 1881/2006 EC sayılı Avrupa Birliği Komisyon Tüzüğü çiğ süt için 0.02 mg/L düzeyinde sınırlama getirmiştir (Anon 2006).

Kadmiyum, endüstriyel kullanımı yaygın kanserojen, toksik bir elementtir. Uzun yarı ömrü (15-30 yıl) ve insan sağlığı üzerinde teratojenik, kanserojenik, hepatotoksik, nefrotoksik, iskelet ve üreme sistemlerine çok yönlü zararlı etkileri nedeniyle en toksik endüstriyel ve çevresel ağır metallerden biri kabul edilmektedir (Boudebouz 2021).

JECFA insanların her kg ağırlığı başına haftalık 0.007 mg/L kadmiyum almasına tolerans tanınmıştır. Öte yandan bazı özel yiyeceklerin alımı ile (örneğin böbrek ve keten tohumu) önerilen değerlerden daha fazla kadmiyum alınabildiği yapılan bir takım çalışmalarda gösterilmiştir. İnek sütünün kadmiyum içeriği 0,0002 mg/L ile 0,0008 mg/L (ortalama 0.0005 mg/L) arasında bulunmaktadır. Bazı ülkeler süt için Tablo 1'de belirtilen kendi kabul edilebilir değerlerini tespit etmiştir (Kınık ve ark. 2001).

Tablo 1. Bazı ülkelerdeki sütte kabul edilebilir kadmiyum düzeyleri

Ülke	Miktar (mg/kg)
Almanya	0.005
Danimarka	0.01
Hollanda	0.005
Avustralya	0.05
Slovakya	0.01

Demir, Bakır ve Çinko toksikolojik etkilerinden ziyade, lipid oksidasyonu nedeniyle süt ve süt ürünlerinin tat ve aromasını olumsuz yönde etkilemektedir.

Bu çalışma, Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin edilen çiğ inek sütlerinde Fe, Cu, Zn, Pb ve Cd düzeylerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, Marmara, Karadeniz, İç Anadolu, Doğu Anadolu, Akdeniz ve Ege bölgelerinden örnekler alınmış, metal içerikleri uygun analitik metodlarla tespit edilerek özellikle mevsimsel değişiklikler literatür bilgileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, Türkiye'nin 6 farklı bölgesinden (Marmara, Karadeniz, İç Anadolu, Doğu Anadolu, Akdeniz ve Ege) 3'er aylık periyotlarla, 4 dönemde temin edilen çiğ inek sütlerinde kurşun, kadmiyum, demir, bakır ve çinko düzeyleri yönünden analizler yapıldı. Bu kapsamda her bölgeden 20 adet olacak şekilde, 120 örnek (Tablo 2) alındı. Örnekler 100 ml miktarda propilen kaplara konuldu. Örnek toplama işlemi, Tarım ve Orman Bakanlığı'nın "Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi için Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik" (Anon, 2011b) ilkeleri doğrultusunda yapıldı. Bu amaçla süt örnekleri süt toplama tanklarından doğrudan alındı ve plastik tüpler içerisinde laboratuvara getirildi. Alınan örnekler analiz edilinceye kadar derin dondurucuda -18° C'de muhafaza edildi.

Tablo 2. Süt numunelerinin toplandığı dönemler

Dönem	Numune Sayısı
1 Aralık 2006 – Şubat 2007	30
2 Mart 2007 – Mayıs 2007	30
3 Haziran 2007 - Ağustos 2007	30
4 Eylül 2007 – Kasım 2007	30

Yöntem

Süt Örneklerin Hazırlanması

Süt örneklerinde metallerin analizleri AOAC metot 999.10 (mikrodalga yakma metodu ile hazırlanan gıdalarda Pb, Cd, Fe, Cu ve Zn düzeyinin AAS ile tespiti) ile gerçekleştirildi (AOAC 2000).

Analiz aşamasında, oda sıcaklığına getirilen dondurulmuş süt örnekleri homojenleştirildi ve teflon kaplara 2'şer ml miktarda alındı. Örneklerin üzerine 5 ml HNO₃ (%65) ve 2 ml H₂O₂ (%30) (Merck, ABD) eklenerek kapakları kapatıldı. Berghof MWS-2 (Almanya) model mikrodalga fırına konulan örnekler Tablo 3'de belirtilen parametrelere göre işleme tabi tutuldu.

Tablo 3. Mikrodalga fırın parametreleri

Aşama	Sıcaklık (°C)	Güç (watts)	Süre (dakika)
1	160	0,8	15
2	210	0,8	15
3	100	0,8	15

İşlemin sonunda teflon kaplar, kapakları açıldıktan 15 dakika süre ile çeker ocak altında soğumaya bırakıldı ve sürenin sonunda açılarak kapak ve teflon kap iç duvarı aşağı doğru deiyonize su ile yıkandı. İçerik süzgeç kâğıdından süzülerek 15 ml'lik propilen tüplere alındı ve üzeri 15 ml'ye kadar bidistile su ile tamamlandı. Bu şekilde örnekler AAS'de analiz edilebilecek forma getirildi, analiz yapılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında bekletildi.

Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi

Işık kaynağı olarak her metalin kendine özgü dalga boyunda ışımaya yapan oyuk katot lambaları, Cd için ise elektrotsuz boşalım lambası kullanıldı. Alevle atomlaştırma için çok sayıda metalin analiz edilmesine uygun bir ortam ve yeterli sıcaklığı (2125–2400°C) sağlayan hava/asetilen karışımı, grafit fırınında ise inert gaz olarak argon kullanıldı. Pb ve Cd analizleri Grafit Fırını AAS (GF-AAS) ve Zeeman zemin düzeltici sistem ile, Fe, Cu ve Zn analizleri ise Alevli AAS (A-AAS) cihazı ile deuterium zemin düzeltici sistem kullanılarak yapıldı. Çalışılan metaller için kullanıcı parametreleri Tablo 4-7'de gösterildi.

Tablo 4. Alevli AAS için analiz parametreleri

Element	Dalga boyu (nm)	Slit açıklığı (nm)	Lamba akımı (mA)	Asetilen (L/dk)	Hava (L/dk)
Fe	248.3	0.2 H	30	2.0	17
Cu	324.8	0.7 H	30	44257	18
Zn	213.9	0.7 H	25	2.0	17

Tablo 5. Grafit Fırını AAS için analiz parametreleri

Parametreler	Pb	Cd
Lamba tipi	C-HCL	EDL
Dalga boyu (nm)	283.3	228.8
Slit açıklığı (nm)	0.7 L	0.7 L
Lamba akımı (mA)	30	230
Örnek hacmi (µl)	20	20
Modifier (µl)	5	5

Tablo 6. Kurşun elementinin sıcaklık programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Yükselme Süresi (s)	Tutma Süresi (s)	Argon Akışı (ml/dak.)
Kurutma1	110	5	15	250
Kurutma2	500	10	25	250
Külleme	900	15	35	250
Atomizasyon	1800	0	1	0
Temizleme	2600	1	2	250

Tablo 7. Kadmiyum elementinin sıcaklık programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Yükselme Süresi (s)	Tutma Süresi (s)	Argon Akışı (ml/dak.)
Kurutma1	110	1	30	250
Kurutma2	130	15	30	250
Külleme	500	10	20	250
Atomizasyon	1500	0	5	0
Temizleme	2450	1	3	250

Atomik Absorpsiyon Spektrometre bağıl bir metot olup bilinmeyen yoğunluğu standart çözeltilerle karşılaştırılarak bulunur. Bunun için cihaz, analiz edilecek her element için 1000 mg/L'lik stok çözeltisinden hazırlanan farklı yoğunluklardaki standartlar (High Purity, ABD) ile kalibre edildi.

Bu çalışmada incelenen Pb, Cd, Fe, Cu ve Zn miktarları Tarım ve Orman Bakanlığı Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Biyokimya Laboratuvarı'ndaki Perkin Elmer AAnalys 800 AAS (ABD) ile ölçülmüştür. Okumanın yapıldığı AAS cihazı 0.001 µg/L hassasiyetle çalışmaktadır. Okuma değerleri bu değerden daha düşük olan veriler, sıfır olarak değerlendirildi ve istatistik analizlerde de eksik gözlem olarak kabul edildi. Fe, Cu, ve Zn düzeyleri Alevli AAS

cihazı ile doğrudan ölçüldü. Grafit Fırınlı AAS cihazı ile çalışmaya başlamadan önce örnek hacimleri, istenilen sıcaklığa ulaşma süresi ve bu sıcaklıkta kalma süresi, kurutma, külleştirme, atomizasyon ve grafit tüpün temizlenmesi aşamalarındaki sıcaklıklar analiz öncesinde en üst düzeyde verim sağlayacak şekilde ayarlandı. Kurşun için $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ve kadmiyum için $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ matrisi değiştirici (modifier) olarak kullanıldı. Her bir numuneden 20 µl olacak şekilde ve üzerine Pb ve Cd için 5µl matrisi değiştirici eklenerek, 3 tekrar analiz gerçekleştirildi ve sonuçların ortalaması alındı. Elde edilen veriler, bilgisayar programı kullanılarak takip edildi. Çalışma sonunda elde edilen verilerin istatistik değerlendirmesi SPSS (16.0.0) istatistik paket programı ile yapıldı. Bu kapsamda, aritmetik ortalama, standart sapma, en alt ve en üst değerler belirlendi. Genel olarak bölgeler ve dönemler arasındaki farklılıkların tespiti ise tek yönlü varyans analizi ve Duncan's testi ile gerçekleştirildi.

Bulgular

Analizlere başlamadan önce, AAS cihazı, her element için belirlenen konsantrasyonlarda standartlar kullanılarak kalibre edildi. Yöntemin duyarlılığını gösterecek geri kazanım çalışmaları sonucunda elde edilen değerler %92,2 – 110,2 aralığında bulundu. Birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü dönemlere ait Pb, Cd, Fe, Cu ve Zn değerleri Tablo 8-11'de verilmiştir.

Tüm dönemlere ait numuneler bir bütün olarak değerlendirildiğinde Pb ortalama değeri $8,38 \pm 9,01$ µg/L olarak tespit edildi. Dönemlere göre en yüksek ortalama Pb değeri $11,57 \pm 13,69$ µg/L ile birinci dönem; en düşük Pb ortalama değeri ise $2,76 \pm 2,16$ µg/L ile ikinci dönemde tespit edildi. Dönem ve bölgelere göre elde edilen değerler.

Kadmiyum ortalama değeri $0,09 \pm 0,09$ µg/L tespit edildi. Dönemlere göre en yüksek ortalama Cd değeri $0,12 \pm 0,12$ µg/L ile birinci dönem; en düşük Cd ortalama değeri ise $0,06 \pm 0,04$ µg/L ile ikinci dönemde tespit edildi.

Bakır ortalama değeri $0,33 \pm 0,23$ mg/L tespit edildi. Dönemlere göre en yüksek ortalama Cu değeri $0,54 \pm 0,16$ mg/L ile ikinci dönem; en düşük Cu ortalama değeri ise $0,23 \pm 0,19$ mg/L ile üçüncü dönemde tespit edildi.

Demir ortalama değeri $0,23 \pm 0,10$ mg/L tespit edildi. Dönemlere göre en yüksek ortalama Fe değeri $0,29 \pm 0,11$ mg/L ile üçüncü dönem; en düşük Fe ortalama değeri ise $0,21 \pm 0,08$ mg/L ile dördüncü dönemde tespit edildi.

Çinko ortalama değeri $3,67 \pm 0,86$ mg/L tespit edildi. Dönemlere göre en yüksek ortalama Zn değeri $4,02 \pm 0,88$ mg/L ile birinci dönem; en düşük Zn ortalama değeri ise $3,18 \pm 0,68$ mg/L ile üçüncü dönemde tespit edildi.

Pb, Cd, Fe, Cu ve Zn ortalama değerleri Şekil 1-5'de verildi.

Tablo 8. Birinci dönem (kış) numunelerde tespit edilen metallerin bölgelere göre düzeyleri

Metal / Bölge	Pb (ppb) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Cd (ppb) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Fe (ppm) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Cu (ppm) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Zn (ppm) Ort. ± SD (En alt-En üst)
İç Anadolu	$9,15 \pm 7,22^a$ (3,00–21,00)	<LOD	$0,25 \pm 0,04^a$ (0,22–0,33)	$0,05 \pm 0,07^a$ (0,01–0,19)	$3,98 \pm 0,42$ (3,60–4,52)
	$13,05 \pm 8,78^{ab}$ (4,50–27,00)	$0,08 \pm 0,02$ (0,07–0,10) (n:3)	$0,34 \pm 0,02^d$ (0,32–0,37)	$0,19 \pm 0,17^a$ (0,02–0,44)	$3,52 \pm 0,73$ (2,78–4,67)
Ege	$27,30 \pm 22,30^b$ (2,25–59,25)	<LOD	$0,24 \pm 0,02^a$ (0,22–0,27)	$0,11 \pm 0,12^{ab}$ (0,04–0,32)	$4,05 \pm 0,26$ (3,78–4,41)
	$13,12 \pm 13,28^a$ (3,75–32,25) (n:4)	$0,07 \pm 0,02$ (0,06–0,10) (n:2)	$0,25 \pm 0,04^a$ (0,19–0,30)	$0,28 \pm 0,14^b$ (0,14–0,51)	$4,68 \pm 1,13$ (3,37–5,72)
Karadeniz	$3,75 \pm 2,05^a$ (0,75–6,00)	<LOD	$0,18 \pm 0,04^b$ (0,11–0,23)	$0,47 \pm 0,18^c$ (0,34–0,66)	$3,66 \pm 0,80$ (2,99–4,98)
	$1,31 \pm 0,37^a$ (0,75–1,50) (n:4)	0,45 (0,45–0,45) (n:1)	$0,09 \pm 0,04^c$ (0,04–0,16)	$0,70 \pm 0,04^d$ (0,66–0,76)	$4,29 \pm 1,35$ (2,23–5,70)

a, b, c, d. Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p < 0,05$).

Tablo 9. İkinci dönem (ilkbahar) numunelerde tespit edilen metallerin bölgelere göre düzeyleri

Metal / Bölge	Pb (ppb) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Cd (ppb) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Fe (ppm) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Cu (ppm) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Zn (ppm) Ort. ± SD (En alt-En üst)
İç Anadolu	3,30±2,58 (0,75-7,50)	0,07±0,08	0,17±0,04 ^{ab} (0,13-0,23)	0,69±0,09 ^a (0,57-0,77)	3,95±0,74 ^{ab} (3,43-5,24)
Marmara	2,50±0,40 (2,25-3,00) (n:3)	0,06±0,04 (0,008-0,10) (n:4)	0,17±0,025 ^{ab} (0,15-0,21)	0,70±0,12 ^a (0,62-0,915)	3,31±0,52 ^a (2,55-3,93)
Ege	2,25± 2,03 (0,75-5,25) (n:4)	0,07±0,04	0,09±0,05 ^a (0,03-0,16)	0,58±0,02 ^b (0,56-0,62)	3,26±0,67 ^a (2,59-4,00)
Akdeniz	1,0 ±0,43 (0,75-3,75) (n:3)	<LOD	0,19±0,11 ^b (0,02-0,30)	0,58±0,52 ^b (0,50-0,63)	3,99±0,47 ^{ab} (3,66-4,76)
Karadeniz	3 (3,00-3,00) (n:1)	<LOD	0,28±0,04 ^c (0,22-0,32)	0,44±0,025 ^c (0,37-0,50)	3,57±0,33 ^a (3,22-4,06)
Doğu Anadolu	4,50± 3,43 (1,50-8,25) (n:3)	<LOD	0,34±0,04 ^c (0,30-0,41)	0,27±0,02 ^d (0,187-0,34)	4,61±1,10 ^b (3,76-6,46)

a, b, c, d. Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir (p<0,05).

Tablo 10. Üçüncü dönem (yaz) numunelerde tespit edilen metallerin bölgelere göre düzeyleri

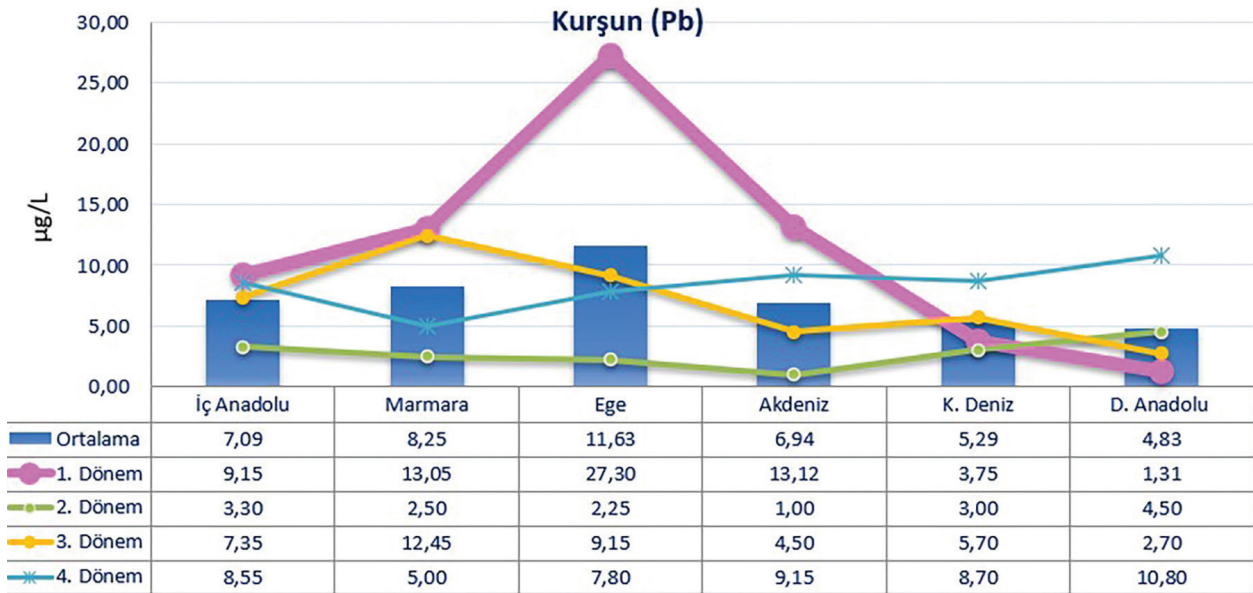
Metal / Bölge	Pb (ppb) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Cd (ppb) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Fe (ppm) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Cu (ppm) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Zn (ppm) Ort. ± SD (En alt-En üst)
İç Anadolu	7,35±10,28 (0,75-25,50)	<LOD	0,36±0,02 ^a (0,33-0,39)	0,10±0,06 ^a (0,03-0,20)	3,44±0,83 ^{ab} (2,48-4,61)
Marmara	12,45±12,46 (3,75-34,50)	<LOD	0,44±0,04 ^c (0,38-0,49)	0,21±0,09 ^{ab} (0,10-0,33)	3,28±0,28 ^{ab} (2,84-3,55)
Ege	9,15± 4,05 (5,25-15,75)	<LOD	0,35±0,07 ^a (0,24-0,44)	0,15±0,17 ^{ab} (0,02-0,43)	2,93±0,42 ^{ab} (2,24-3,36)
Akdeniz	4,50±1,91 (3,00-7,50)	<LOD	0,21±0,09 ^b (0,14-0,36)	0,07±0,03 ^a (0,02-0,13)	2,55±0,70 ^a (1,92-3,46)
Karadeniz	5,70 ±5,2 (2,25-15,00)	<LOD	0,22±0,02 ^b (0,19-0,26)	0,52±0,09 ^c (0,37-0,59)	3,52±0,71 ^b (2,66-4,30)
Doğu Anadolu	2,70± 3,95 (0,75-9,75)	<LOD	0,18±0,03 ^b (0,13-0,23)	0,32±0,11 ^b (0,04-0,64)	3,37±0,79 ^{ab} (2,06-4,03)

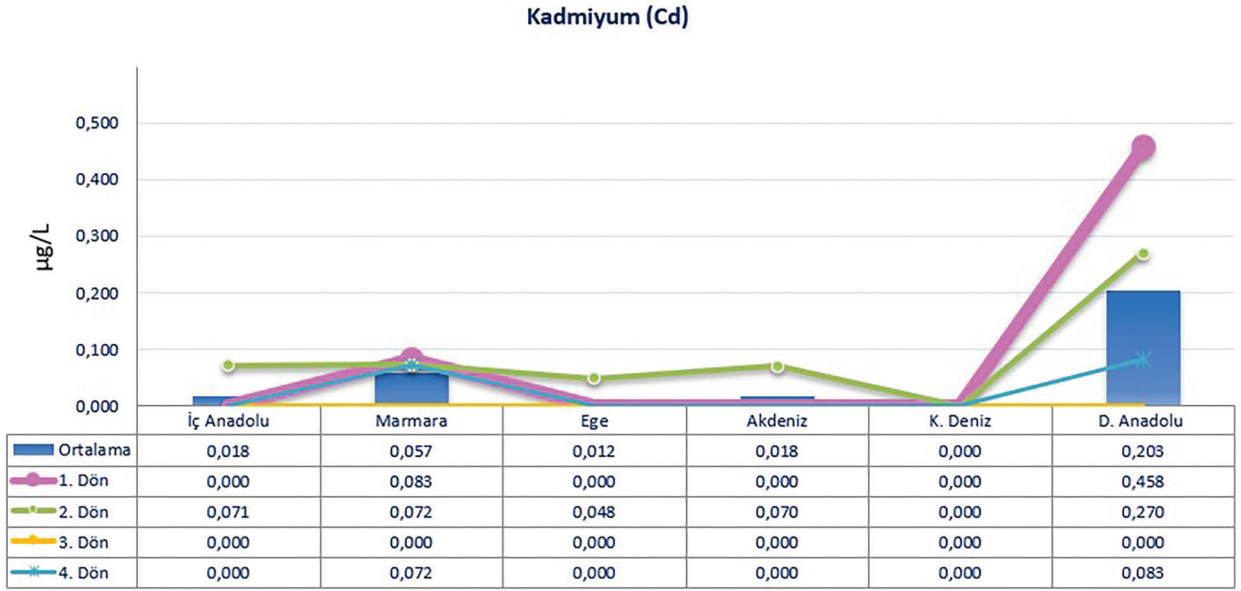
a, b, c, d. Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir (p<0,05).

Tablo 11. Dördüncü dönem (sonbahar) numunelerde tespit edilen metallerin bölgelere göre düzeyleri

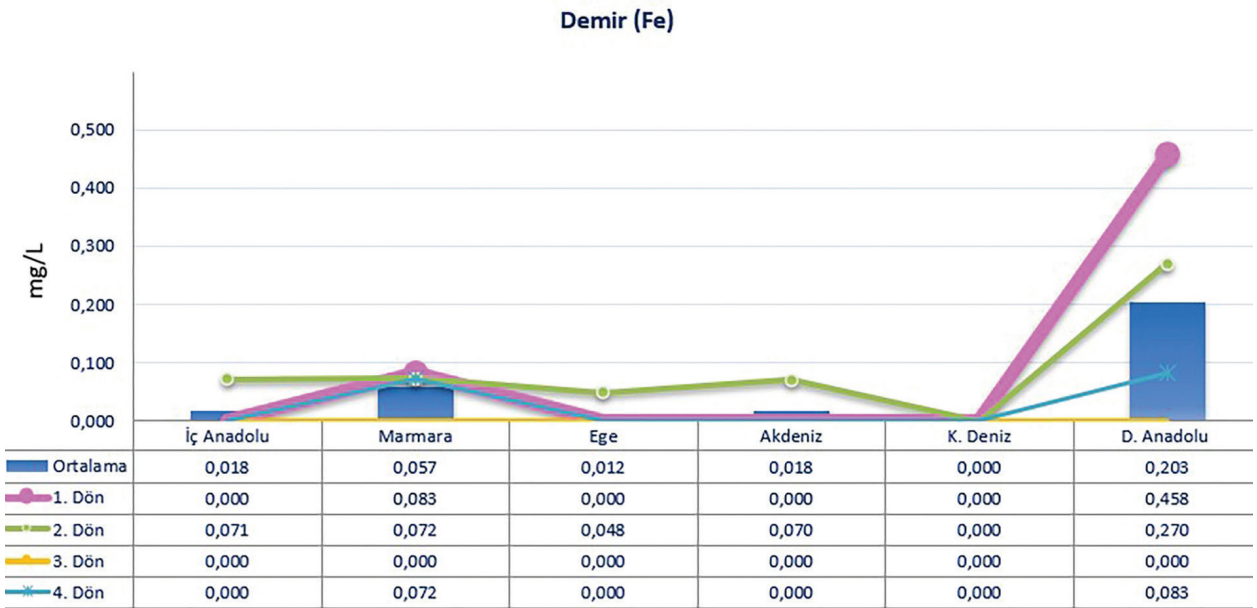
Metal / Bölge	Pb (ppb) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Cd (ppb) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Fe (ppm) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Cu (ppm) Ort. ± SD (En alt-En üst)	Zn (ppm) Ort. ± SD (En alt-En üst)
İç Anadolu	8,55±5,50 ^a (3,75–18,00)	<LOD	0,28±0,07 ^a (0,22–0,39)	0,25±0,19 ^{ab} (0,11–0,54)	3,30±0,40 ^{ab} (2,90–3,85)
Marmara	17,25±6,64 ^b (10,50–26,25)	<LOD	0,30±0,05 ^a (0,22–0,34)	0,41±0,15 ^b (0,21–0,56)	3,46±0,52 ^{abc} (2,76–4,16)
Ege	7,80± 2,98 ^a (5,25–12,00)	<LOD	0,27±0,06 ^{ab} (0,18–0,32)	0,15±0,10 ^a (0,2–0,26)	4,20±0,48 ^{bc} (3,82–5,02)
Akdeniz	9,15±3,84 ^a (3,00–13,50)	<LOD	0,15±0,34 ^c (0,11–0,20)	0,28±0,23 ^{ab} (0,03–0,53)	2,92±1,36 ^a (0,72–4,00)
Karadeniz	8,70 ±3,16 ^a (3,75–11,25)	<LOD	0,12±0,01 ^c (0,10–0,13)	0,35±0,21 ^{ab} (0,06–0,53)	4,48±0,40 ^c (3,88–4,89)
Doğu Anadolu	10,80± 3,77 ^a (0,75–1,50)	0,46 (n: 1)	0,19±0,05 ^{bc} (0,04–0,16)	0,22±0,04 ^{ab} (0,12–0,56)	3,93±0,85 ^{abc} (2,24–5,02)

a, b, c, d. Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir (p<0,05).

**Şekil 1.** Kurşun yönünden 1, 2, 3 ve 4. dönemlerde tespit edilen ortalama değerler (µg/L)

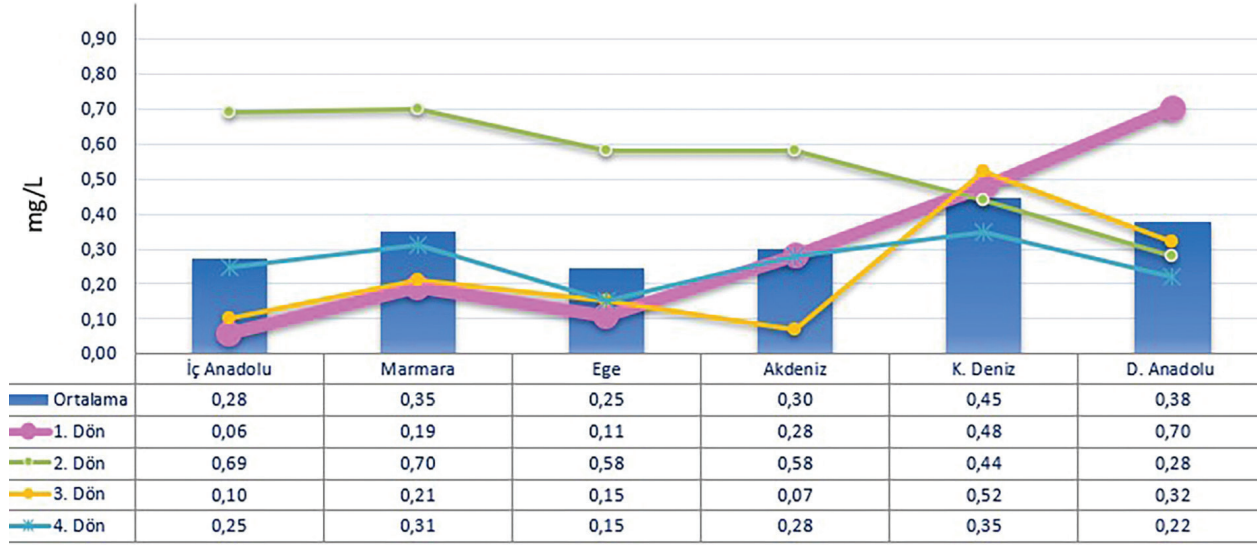


Şekil 2. Kadmiyum yönünden 1, 2, 3 ve 4. dönemlerde tespit edilen ortalama değerler (µg/L)



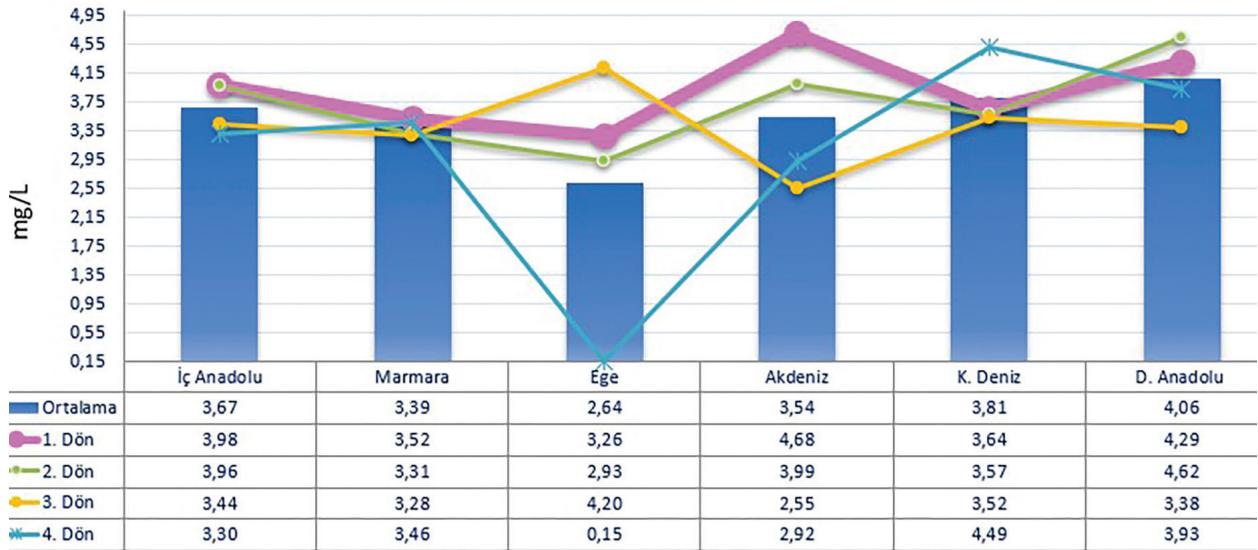
Şekil 3. Demir yönünden 1, 2, 3 ve 4. dönemlerde tespit edilen ortalama değerler (mg/L)

Bakır (Cu)



Şekil 4. Bakır yönünden 1, 2, 3 ve 4. dönemlerde tespit edilen ortalama değerler (mg/L)

Çinko (Zn)



Şekil 5. Çinko yönünden 1, 2, 3 ve 4. dönemlerde tespit edilen ortalama değerler (mg/L)

Tartışma ve Sonuç

Hızlı nüfus artışı ve endüstriyel faaliyetlere bağlı olarak, çevre ve besinsel kirlenme önemli halk sağlığı ve tarımsal problemleri beraberinde getirmektedir. Hayvan ve insan beslenmesinde önemli olan bazı besin maddeleri, canlılara zarar verebilecek düzeylerde metal kalıntıları içerebilmektedir. Fabrika baca

gazlarından ve maden ocaklarından çevreye, atmosfere, suya ve toprağa dolayısıyla insan ve hayvan besin zincirine toksik maddelerin karışımı mümkündür. Toksik element ve ağır metaller boya, otomotiv ve oyuncak sektörleri, inşaat, trafik ve metal endüstrileri ile tarımsal gübre yapımında yoğun olarak kullanılmaktadır (Vıcıl 2012).

Ülkemizde Ulusal Kalıntı İzleme Planında, B3c-Kimyasal Elementler kapsamında sadece kurşun düzeyleri konusunda izleme yapılmaktadır (Anon 2011b).

2006 yılı Ülkemizde Ulusal Kalıntı İzleme Planı kapsamında ağır metaller (Kurşun) için, 51 numune alınması planlanmış, 44 numune analiz edilmiş ve bunlardan 8'i Pb yönünden Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğde kabul edilen 20 µg/L olan maksimum kalıntı limitini aştığı belirlenmiştir. Geri izleme için yeni alınan numunelerde ise Pb düzeylerinin maksimum kalıntı limitlerini aşmadığı görülmüştür (Anon 2011c).

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen analizlerde Türkiye genelinde 107 örneğe ait ortalama kurşun düzeyleri 0,008±0,009 mg/L bulundu. Örneklerdeki en yüksek kurşun değeri ise 0,059 mg/L olarak tespit edildi. Analiz edilen örnekten 10'unun (%8,3) Pb yönünden Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğde ve Avrupa Birliği 1881/2006 EC direktiflerinde kabul edilen 0,02 mg/L olan maksimum kalıntı limitlerini aştığı ancak genel Pb ortalamasının bu değer altında olduğu görüldü. Diğer metaller yönünden herhangi bir kalıntı limiti belirlenmediği için bu yönde bir değerlendirme yapılmadı.

Bölgeler arası değerlendirmede istatistiki açıdan önemli farklılıklar belirlendi. En yüksek ortalama Pb değeri 12,29±9,46 µg/L ile Marmara Bölgesinde, en düşük ortalama Pb değeri ise 5,07±4,95 µg/L ile Doğu Anadolu Bölgesinde tespit edildi. Kurşun ortalama değeri bölgelere göre sıralandığında miktar yönünden azalan sırayla Marmara > Ege > Akdeniz > İç Anadolu > Karadeniz > Doğu Anadolu Bölgesi şeklinde tespit edildi.

Dönemler açısından değerlendirildiğinde ise en yüksek ortalama Pb değeri 11,57±13,69 µg/L ile birinci dönemde (kış), en düşük ortalama Pb değeri ise 2,76±2,16 µg/L ile ikinci dönemde (ilkbahar) tespit edildi. Pb ortalama değeri dönemlere göre sıralandığında miktar yönünden azalan sırayla kış > sonbahar > yaz > ilkbahar şeklinde ortaya çıktı.

Kadmiyum yönünden çeşitli Avrupa ülkelerinde belirlenen maksimum kalıntı limitlerinin altında kaldığı belirlendi. Kirliliğin insan sağlığı açısından tehdit edici seviyede olmadığı anlaşıldı. Cu, Fe, ve Zn yönünden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ise bu metallerin de normal sınırlar içerisinde olduğu ve insan sağlığı yönünden risk oluşturacak düzeyde olmadığı tespit edildi.

Sütlerde kalite değerlendirmesi ve çevresel kirliliğin belirlenmesi amacıyla ülkemizde farklı araştı-

ricılar tarafından bazı çalışmalar Gültekin (1998); Algan (2002); Özrenk (2002); Şenol ve Özdemir (2003); Temurci (2006); Ayar ve ark. (2007); Temiz ve Soylu (2012); Kaptan ve ark. (2016); Bakırcıoğlu ve ark. (2018) yapılmıştır.

Gültekin (1998) tarafından yapılan çalışmada, Bursa ili ve çevresinden alınan 75 süt örneğinde trafik yoğun bölgelerde, sanayi bölgelerinde ve kırsal bölgelerde olma durumuna göre bazı mineral madde ve ağır metallerin tespiti yapılmıştır. Araştırma sonucunda, analiz edilen süt örneklerinde Pb düzeyi, trafik yoğun bölgelerde 0,032±0,002 mg/L (0,023–0,040 mg/L), sanayi bölgelerinde 0,049±0,001 mg/L (0,042–0,058 mg/L) ve kırsal bölgelerde 0,018±0,00 mg/L (0,017–0,021 mg/L), Cu düzeyi trafik yoğun bölgelerde 0,58±0,026 mg/L (0,47–0,70 mg/L), sanayi bölgelerinde 0,96±0,038 mg/L (0,77–0,96 mg/L) ve kırsal bölgelerde 0,39±0,012 mg/L (0,33–0,45 mg/L), Fe düzeyi trafik yoğun bölgelerde 1,78±0,16 mg/L (1,26–2,60 mg/L), sanayi bölgelerinde 4,27±0,26 mg/L (2,65–5,30 mg/L) ve kırsal bölgelerde 1,01±0,029 mg/L (0,80–1,01 mg/L), Zn düzeyi trafik yoğun bölgelerde 4,49±0,39 mg/L (2,30–6,46 mg/L), sanayi bölgelerinde 5,01±0,26 mg/L (3,75–6,45 mg/L) ve kırsal bölgelerde 3,77±0,18 mg/L (2,60–4,72 mg/L) olarak belirlenmiş, sanayi bölgesinden alınan örneklerde Fe ve Cu miktarı normal değerlerin üzerinde bulunmuştur. Pb için ise sanayi ve trafik yoğun bölgelerden alınan örneklerdeki Pb miktarı için Avrupa Birliği EC 315/93 direktiflerinde belirtilen 0.02 mg/L'in üzerinde bulunmuştur.

Algan (2002) tarafından yapılan çalışmada Konya yöresinden alınan 61 süt örneğinde bazı ağır metal miktarlarının tespitini yapmışlardır. Analiz edilen süt örneklerinde Pb 0,0001 µg/L, Cd 0,04 µg/L ve Zn 2,66 mg/L düzeylerinde tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada Pb, Cd ve Zn yönünden normal sınırlar içerisinde olup bir kirlilik tespit edilmemiştir.

Özrenk (2002) tarafından yapılan Van ili ve çevre ilçelerinde üretilen inek sütlerinin ağır metal kirliliği ve bazı mineral içeriklerinin belirlenmesi çalışmasında, yaz mevsiminde 130, kış mevsiminde 130 toplam 260 örnekte çalışılmıştır. Analiz edilen süt örneklerinin 189'unda ortalama 0,002±0,01 mg/L (0,001–0,007) Pb tespit edilmiştir. Fe düzeyi 0,31±0,17 mg/L (0,050–0,890), Cu düzeyi 0,182±0,157 mg/L (0,10–0,830) ve Zn 3,00±1,09 mg/L (0,17–5,28) olarak tespit edilmiştir. Analiz edilen örneklerde ilçeler arası farklılık bulunmamasına rağmen, mevsimsel değişiklik tespit edilmiş ve bunun sebebinin Van gibi kış günlerinin soğuk ve uzun geçtiği bir ilde yakılan soba ve kaloriferlerin yanma süresinin uzun olması, kullanılan kömür miktarının fazla ve kalitesiz olması

gösterilmiştir. Özellikle Pb, Fe, Cu ve Zn düzeylerinin kışık yemlerde daha yüksek olduğu ve bu artışın kışık sütlerde de gözlemlendiği bildirilmiştir.

Şenol ve Özdemir (2003) tarafından yapılan Sakarya ili ve çevre ilçelerinde trafik yoğunluğu farklı (az yoğun, orta yoğun, çok yoğun) 3 bölgeden alınan 45 adet süt numunesinde çinko düzeyleriyle ilgili çalışmada Zn düzeyleri sırasıyla, 3,35 mg/L (1,26–6,56), 3,70 mg/L (1,79–5,24), 3,85 mg/L (2,78–5,41) tespit edilmiştir.

Temurci (2006) tarafından Ankara'da tüketime sunulan süt ve beyaz peynirlerde yapılan bir çalışmada 36 süt örneği kullanılmış, bu örneklerin hiç birinde Pb'ye rastlanılmamıştır. Cd düzeyi ise $0,11 \pm 0,03$ mg/L (0- 1,16), bakır düzeyi $4,30 \pm 0,36$ mg/L (1,5–13,66), Fe düzeyi ise $52,19 \pm 4,09$ mg/L (17,16–128,42) bulunmuştur.

Ayar ve ark. (2007) tarafından Konya'da tüketime sunulan süt ve ürünleri değişik süt işletmelerinden ve diğer satıcı marketlerden 4 ay süreyle farklı olacak şekilde 2 şer örnek, her birinden 8 adet olacak şekilde toplam 96 örnek alınmıştır. Pb düzeyi 0.103 ± 0.14 mg/L, Cd düzeyi ise 0.017 ± 0.010 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Temiz ve Soylu (2012) tarafından Samsun ilinde 144 adet örnekte indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometre ile gerçekleştirilen çalışmada 0.028–0.068 mg/L aralığında Pb, 0.001-0.013 mg/L aralığında Cd, 0.618-1.889 mg/L aralığında Cu, 0.12-0.64 mg/L aralığında Fe, 11.597-14.907 mg/L aralığında Zn tespit edildiği, Pb, Cd ve Cu yönünden yaz döneminde toplanan örneklerin kış dönemine göre daha yüksek olduğu, Pb, Cu, Zn yönünden bu sütlerin güvenilir olmadığı, çalışma alanındaki çevresel bulaşmanın yoğun endüstriye atfedildiği bildirilmiştir.

Kaptan ve ark. (2016) tarafından Çanakkale Biga İlçesinde 3 farklı bölge (yoğun endüstriye yakın, gıda üreten fabrikalara yakın, otoyola yakın) ve 3 farklı dönemde alınan örneklerde İndüklenmiş Eşleşmiş Plazma Atomik Emisyon Spektroskopi ile gerçekleştirilen çalışmada (0.503-1.859 mg/L arasında değişen düzeylerde olmak üzere 1.011 ± 0.36 mg/L ortalama Pb tespit edildiği, en yüksek kurşun düzeyinin otoyola yakın olan bölgedeki süt örneklerinde bulunduğu, $0.027-0.397$ mg/L Cd (0.124 ± 0.11 mg/L ortalama), $0.755-3.046$ mg/L olmak üzere 1.9005 mg/L ortalama Zn ve Cd'nin yine yoğun trafik bölgesindeki ineklerden toplanan örneklerde tespit edildiği, en yüksek Cu düzeyinin 1.564 µg/L ile yaz döneminde tespit edildiği, sütteki Cu düzeylerinin yaz sezonunda bitki koruma ürünü kullanımı

ve endüstriyel emisyonlar nedeniyle artabileceği, lıpit oksidasyonundaki katalitik etkisi yönünden süt ürünlerinde potansiyel risk oluşturan Fe için en yüksek konsantrasyonun 4.207 mg/L olarak yoğun trafik bölgesindeki ineklerden toplanan örneklerde tespit edildiği bildirilmiştir.

Bakırcıoğlu ve ark. (2018) tarafından İndüklenmiş Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopi ile Edirne ilinden toplanan 90 adet süt örneğinde gerçekleştirilen çalışmada doğal ürünlerde ortalama 0.138 ± 0.016 mg/L Cu, 3.1 ± 0.5 mg/L Fe, 3.4 ± 0.7 mg/L Zn, marketten alınan ticari örneklerde 0.138 ± 0.041 mg/L Cu, 2.2 ± 1.3 Fe, 3.5 ± 0.7 mg/L Zn tespit edildiği, bu bilgilere göre ticari ürünlerde doğal ürünlere göre daha yüksek düzeylerde bulunduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Pb yönünden Algan (2002); Özrenk (2002); Temurci (2006) ve Kaptan ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmalardan yüksek; Gültekin (1998); Ayar ve ark. (2007) ile Temiz ve Soylu (2012) tarafından yapılan çalışmalardan ise düşük bulundu. Gültekin (1998) tarafından yapılan çalışmada elde edilen trafik yoğun bölge ve sanayi bölgesi örnekleri, Ayar ve ark. (2007) ve Temiz ve Soylu (2012) tarafından analiz edilen tüm örneklerin kurşun düzeyleri kabul edilebilir limitin üzerindedir. Kurşun yönünden kabul edilebilir maksimum limitlerin üzerinde tespit edilen 10 örneğin dördünün Marmara, üçünün Ege, ikisinin İç Anadolu ve birinin de Akdeniz Bölgesine ait sütlerde tespit edilmesi, trafik açısından yoğun bölgeler ve sanayi bölgeleri örneklerindeki ağır metal kirliliği ile uyumlu bulundu. Sütlerde metal düzeyi toprağın yapısı, bitki örtüsü, iklim şartları ve endüstriyel faaliyet şartlarından etkilenmektedir. Dolayısı ile çalışmalar arasında böyle bir farklılığın olması bu sebepler bağlı olarak değerlendirilebilir.

Kadmiyum yönünden Özrenk (2002) tarafından yapılan çalışmadaki elde edilen sonucun yaklaşık iki katı yüksek; Temurci (2006); Ayar ve ark. (2007); Temiz ve Soylu (2012) ve Kaptan ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışma sonuçlarından ise oldukça düşük bulundu.

Demir yönünden Özrenk (2002) ve Temiz ve Soylu (2012) tarafından yapılan çalışmadaki elde edilen sonuçlardan biraz düşük; Gültekin (1998); Şenol (2004) tarafından yapılan çalışmalardaki elde edilen sonuçlardan düşük, Temurci (2006); Kaptan ve ark. (2016) ve Bakırcıoğlu ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışma sonuçlarından ise oldukça düşük bulundu.

Bakır yönünden Özrenk (2002) tarafından yapılan çalışmadaki elde edilen sonuçlardan yüksek; Gültekin (1998); Temiz ve Soylu (2012) ve Bakırcioğlu ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada elde edilen kırsal bölge sonuçları ile uyumlu, trafik yoğun bölge ve sanayi bölgesi örneklerinden düşük bulundu.

Çinko yönünden Gültekin (1998); Özrenk (2002); Şenol ve Özdemir (2003) ve Bakırcioğlu ve ar. (2018) tarafından yapılan çalışmada elde edilen kırsal bölge sonuçları ile uyumlu; trafik yoğun bölge ve sanayi bölgesi örnekleri ile Temiz ve Soylu (2012) düşük, Kaptan ve ark. (2016) çalışmalarından yüksek bulundu.

Uluslararası alanda sütlerde kalite değerlendirilmesine yönelik veya çevresel kirliliğin belirlenmesi amacıyla yapılmış çok sayıda çalışma Vidovic ve ark. (1997); Lawal ve ark. (2006); Bilandžić ve ark. (2016); Qu ve ark. (2018); Norouzirad ve ark. (2018) ve Peinado ve ark. (2020) vardır.

Vidovic ve ark. (1997) tarafından Sırbistan'da yapılan bir çalışmada 1996 ve 1997 yılları arasında toprak, kuru ot ve süt örneklerindeki Pb, Cd ve Zn düzeylerini belirlemişlerdir. 1996 yılında 96 süt örneğinde, Pb düzeyi $0,078 \pm 0,042$ µg/l, 1997 yılında $0,089 \pm 0,046$ µg/l, Cd düzeyi 1996 yılında $0,008 \pm 0,004$ µg/l, 1997 yılında $0,007 \pm 0,003$ µg/l ve Zn düzeyi 1996 yılında $1,88 \pm 0,5$ µg/l, 1997 yılında $1,64 \pm 0,4$ µg/l düzeylerinde tespit edilmiş ve toprak, kuru ot ve süt arasında doğru orantı tespit etmişlerdir.

Lawal ve ark. (2006) tarafından Nijerya'da merada otlatılan sığırlara ait 24 süt örneğini Pb, Cd ve Cu yönünden incelemişlerdir. Pb düzeyi $0,53 \pm 0,29$ mg/L, Cd düzeyi $0,26 \pm 0,13$ mg/L ve Cu düzeyi $0,062 \pm 0,026$ mg/L bulunmuştur. Bulunan sonuçlara göre, Pb düzeyinin WHO tarafından belirlenen günlük kabul edilebilir en fazla doz olan $0,05$ mg/L vücut ağırlığı ve Cd düzeyinin de WHO tarafından belirlenen günlük kabul edilebilir en fazla doz olan $0,02-0,06$ mg/L vücut ağırlığı geçtiğini bildirmişlerdir.

Bilandžić ve ark. (2016) tarafından yayınlanan, Hırvatistan'ın kırsal alanlarındaki 249 adet inekten toplanan çiğ süt örneklerinde 2010-2014 yıllarını kapsayan, grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrometre ile gerçekleştirilen çalışmada kurşun miktarının $10.8-12.2$ µg/kg, en yüksek kurşun seviyesinin 131 µg/kg olduğu bildirilmiştir. Bu konsantrasyonların, izin verilen haftalık kurşun alımının % 1.37 katkı sağlayacağı, bu verilere dayanarak süt tüketiminin tüketici sağlığı yönünden risk oluşturmadığı sonucuna ulaşıldığı bildirilmiştir.

Qu ve ark. (2018) tarafından Çin'de 178 adet ineğe ait sütlerde indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometre ile gerçekleştirilen çalışmada 1.35 ± 0.32 µg/L düzeyinde kurşun tespit edildiği, kadmiyum tespit edilemediği bildirilmiştir. Tespit edilen kurşun düzeyinin tüketiciler yönünden sağlık riski oluşturmadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte kurşun tüketimine bağlı risklerin bebekler ve genç yaştaki çocuklar için yetişkinlere göre daha ciddi olduğu ifade edilmiştir.

Norouzirad ve ark. (2018) tarafından 2015-2016 yıllarını kapsayan 118 adet ineğe ait sütlerde grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrometre ile gerçekleştirilen çalışmada ortalama 47.0 ± 3.9 µg/kg kurşun, 4.7 ± 1.0 µg/kg kadmiyum tespit edildiği, örneklerin % 82.2'sinin kurşun yönünden izin verilen 20 µg/kg limitinin üzerinde olduğu, çalışma sonuçlarına göre petrol yataklarına yakın bölgelerde kurşun ve kadmiyum maruziyeti yönünden sütlerin risk oluşturduğu belirtilerek izleme planlarına dahil edilmesi önerilmiştir.

Peinado ve ark. (2020) tarafından alevli atomik absorpsiyon spektrometre ile Peru'da La Oroya metalürjik kompleksi yakınındaki kırsal alanda yetiştirilen 20 ineğin kanlarında 0.38 ± 0.041 , sütlerinde 0.58 ± 0.018 mg/L kurşun tespit ettikleri, kurşun seviyesinin sütteki oranının kan konsantrasyonundan % 54 yüksek olduğu, kadmiyum seviyelerinin kanda 0.016 ± 0.002 , sütte 0.02 ± 0.007 mg/L olduğu, sütteki kadmiyum oranının kandaki konsantrasyondan % 28 yüksek olduğu bildirilmiştir. Günlük 200 ml'lik süt tüketiminin 0.12 mg kurşun ve 0.004 mg kadmiyum sağlayacağı; bu miktarların 180 gün sonra kümülatif olarak 216 mg kurşun ve 0.72 mg kadmiyum alımını temsil ettiği, insan tüketimi için uygun olmayan bu miktarın halk sağlığı yönünden ciddi risk oluşturduğu ifade edilmiştir.

Boudebouz ve ark. (2021) tarafından, 2010 yılından itibaren dünya çapında yayınlanmış 60 orijinal araştırmanın dahil edildiği sistematik derlemede en yüksek Cd seviyesinin Hindistan'da barit maden sahasında 12 mg/L, en yüksek Pb (60 mg/L), Cu (36 mg/L) seviyelerinin Hindistan'da granit ve granit gnaysdan oluşan alanlarından toplanan örneklerde, en yüksek Fe düzeyinin 37.02 mg/L yine Hindistan'da tespit edildiği bilgisi paylaşılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Pb yönünden Vidovic ve ark. (1997); Bilandžić ve ark. (2016); Qu ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmalardan yüksek; Lawal ve ark. (2004), Norouzirad ve ark. (2018) ile Peinado ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmalardan düşük bulundu.

Kadmiyum yönünden Vidovic ve ark. (1997); Peinado ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmalardan yüksek; Lawal ve ark. (2004); Norouzrad ve ark. (2018); Peinado ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmalardan ise düşük bulundu.

Sonuçlar yurt dışı çalışmalarla karşılaştırıldığında, Sırbistan'dan yüksek bulunmasının sebebinin iklim özelliklerinin daha ılıman olması ve araştırma yapılan bölgelerin endüstriyel alanlardan uzak olması düşünülmektedir. Nijerya ve Peru'da yapılan çalışmadan düşük bulunmasının sebebi ise, Nijerya topraklarının metalleri yüksek yoğunlukta içermesi (özellikle demir ve alüminyum), petrokimya endüstrisinin gelişmiş olması ve çok sayıda rafineri bulunmasına bağlı olduğu, Peru'da yüksek bulunmasının sebebinin de büyük kapasitedeki bir metalürjik komplekse yakın olması düşünülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, bazı uluslararası limitlerle (Komisyon Direktifi EC No: 1881/2006) karşılaştırıldığında Pb yönünden örneklerin 10'unun (%8,3) maksimum kalıntı limitlerini aştığı, ancak genel ortalamanın bu değerin altında olduğu görüldü.

Süt, çeşitli nedenlerle kontaminasyonlara duyarlı bir üründür. Süt sığırlarının merada beslenmeleri sırasında toprakta doğal olarak da bulunan ağır metaller, otlara bulaşan endüstriyel kalıntılar, çeşitli pestisit kalıntıları, hayvanların tedavisinde kullanılan çeşitli hormonlar ve ilaçlar, kalitesiz yemlerden süte geçiş yapan aflatoksin ve mikotoksinler, parazitler ve deterjan kalıntıları direkt olarak süte geçebilmektedir. Süt ve ürünlerinde bulunma olasılığı yüksek olan ve tüketici tarafından fazla bilinmeyen sağlığa zararlı kalıntı maddeler, toplum sağlığı açısından büyük tehlike oluşturmaktadır.

Kaliteli süt üretimi, ekonomik anlamda ve sağlık açısından çok önemlidir. Süt sığırcılığının ve süt sanayinin gelecekteki anahtarıdır. Süt üretim faaliyetlerinin muhtemel ağır metal kirliliğine yol açabilecek alanlardan uzak yerlerde yapılması daha uygun olacaktır. Ülkemizde Pb yönünden limit değerleri belirlenmekle birlikte Cd içinde limit değerinin Avrupa ülkeleri ile uyumlu olarak belirlenmesi gerekmektedir.

Gerek Pb gerekse diğer metallerin süt ve süt ürünlerindeki düzeyinin aşağıya çekilebilmesi için;

- Daha bilinçli ve daha kontrollü bir şekilde üretim işlemi gerçekleştirilmelidir.
- Çiftçi ve işletmecilerin bilgilendirilmesi bir zorunluluktur.
- Ağır metal kalıntılarının önemine ilişkin kamuoyu bilgilendirme çalışmaları yapılmalıdır.

• Bilgilendirmenin yanında etkin bir kontrol mekanizmasının devlet tarafından uygulanmaya konulması da bu metallerin kontaminasyonunun engellenmesinde önemli rol oynayacaktır.

• Ağır metal kalıntılarına ilişkin özellikle riskli bölgeler de göz önüne alınarak geniş ölçekte kalıntı analizleri yapılmalıdır.

• Analiz noktasında uygun laboratuvar şartları/ekipman sağlanmalıdır.

• Sadece süt üretiminin değil yem üretiminin de endüstriyel alanlardan uzak bölgelerde yapılması gereklidir.

Deney hayvanları kullanımı etik kurulu ve diğer etik kurul kararları ve izinler: Etik kurul kararına gerek bulunmamaktadır.

Maddi destek ve çıkar ilişkisi Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkara dayalı ilişkisi yoktur.

Kaynaklar

- Algan G. (2002) Konya yöresi sütlerinde bazı ağır metallerin incelenmesi. Yüksek lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Anon. (2006) Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Erişim adresi: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32006R1881&from=EN>, Erişim tarihi: 12.02.2021
- Anon. (2011a) Hayvansal Gıdalar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği Resmi Gazete, 27.12.2011 Tarih ve 28155 Sayı Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111227-10.htm>, Erişim tarihi: 12.02.2021
- Anon. (2011b) Canlı Hayvanlar Ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler İle Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik. T. C. Resmi Gazete, 17.12.2011 Tarih ve 28145 Sayı. Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111217-4.htm>, Erişim tarihi: 12.02.2021
- Anon. (2011c) Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği T.C. Resmi Gazete, 29.12.2011 Tarih ve 28157 Sayı. Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-8.htm>, Erişim tarihi: 12.02.2021
- Anon. (2019) Türk Gıda Kodeksi İçme Sütleri Tebliği, (Tebliğ No: 2019/12). Resmi Gazete, 27.02.2019 Tarih ve 30699 Sayı. Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2019/02/20190227-5.htm>, Erişim tarihi: 12.02.2021
- AOAC. (2000) Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th Ed., AOAC International Gaithersburg. Md, Usa Official Method 999.10. Chapter 9 p:16
- Ayar A, Sert D, Akın N. (2007) Konyada Tüketime Sunulan Süt ve Ürünlerinin Ağır Metal İçeriklerinin Belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 21 (41): (2007) 58-64
- Bakırcıoğlu D, Topraksever N, Yurtsever S, Kızıldere M, Bakırcıoğlu YK. (2018) Investigation of macro, micro and toxic element concentrations of milk and fermented milks products by using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer, to improve food safety in Turkey, *Microchemical Journal*, Volume 136, 2018, Pages 133-138, ISSN 0026-265X, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.10.014>.
- Bilandžić N, Sedak M, Čalopek B. (2016) Lead Concentrations in Raw Cow and Goat Milk Collected in Rural Areas of Croatia from 2010

- to 2014. *Bull Environ Contam Toxicol* 96, 645–649 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1749-z>
- Boudebouz A, Boudalia S, Bousbia A, Habila S, Boussadia MI, Guerou Y. (2021) Heavy metals levels in raw cow milk and health risk assessment across the globe: A systematic review. *Science of The Total Environment*, Volume 751, 141830. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141830>.
- Gültekin R. (1998) Bursa ili çevresinden alınan çiğ süt örneklerinde bazı mineral madde ve ağır metallerin tespiti üzerine bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Kaptan B, Bilgücü E, Palabıyık İ, Öksüz Ö. (2016) The Effect of Environmental Factors on Heavy Metal and Mineral Compositions of Raw Milk and Water Samples. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13 (4).
- Kaya S, Akar F. (1998) Metaller, diğer inorganik maddeler ve radyoaktif maddeler. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Ed.: S. Kaya, İ. Pirinççi, A. Bilgili. 1. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, s. 122-138.
- Kınık Ö, Uysal H R, Akbulut N. (2003) Süt ve Süt Ürünlerinde İz Elementler. E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları No: 549. E.Ü.Basımevi, Bornova, İzmir, 163s.
- Lawal AO, Mohammed SS, Damisa, D. (2006) Assessment of levels of Copper, Cadmium and Lead in secretion of mammary gland of cows grazed on open fields. *Science World Journal*. 1. 7-10. 10.4314/swj.v1i1.51689.
- Norouzirad R, Montaña JRG, Pastor FM, Hosseini H, Shahrouzian A, Khabazkhoob M, Malayeri FA, Bandani HM, Paknejad M, Foroughinia B, Moghaddam AF. (2018) Lead and cadmium levels in raw bovine milk and dietary risk assessment in areas near petroleum extraction industries, *Science of The Total Environment*. Volume 635, Pages 308-314. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.138>.
- Özrenk E. (2002) Van ili ve çevre ilçelerinde üretilen inek sütlerinin ağır metal kirlilik düzeyi ve bazı mineral madde içerikleri. Doktora tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Peinado DMC ve Bedriñana JIC. (2020) Lead and cadmium blood levels and transfer to milk in cattle reared in a mining area. *Helvion*, Volume 6, Issue 3, e03579, <https://doi.org/10.1016/j.helivion.2020.e03579>.
- Qu XY, Zheng N, Zhou XW, Li SL, Wang JQ, Zhang WJ. (2018) Analysis and Risk Assessment of Seven Toxic Element Residues in Raw Bovine Milk in China. *Biol Trace Elem Res* 183, 92–101 <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1116-x>
- Şenol AS ve Özdemir S. (2003) Sakarya bölgesinde kırsal ve kentsel bölgelerden toplanılan sütlerde çinko düzeylerinin belirlenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 7. Cilt 3. Sayı Eylül 2003, 194-196
- Tekinşen OC. (2000) Süt ürünleri teknolojisi (3.baskı). Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi, 329 s.
- Temiz H ve Soylu A. (2012) Heavy metal concentrations in raw milk collected from different regions of Samsun, Turkey. *International Journal of Dairy Technology*, 65: 516-522. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00846.x>
- Temurci H ve Güner A. (2010) Ankara'da Tüketime Sunulan Süt ve Beyaz Peynirlerde Ağır Metal Kontaminasyonu. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 1 (2) , 20-28. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ataunivbd/issue/2904/40261>
- Vıcal S, Erdoğan S, Uygur V. (2012) Akdağmadeni bölgesi toprak, bitki, koyun kan ve yün örneklerinde bazı esansiyel ve toksik element düzeylerinin saptanması. *Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi*. 2012,2 (2):15-21



Rodentlerde yaygın bir zoonotik etken: Bartonella

Derya Karataş Yeni¹

¹ Veteriner Kontrol Merkez araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Etlık, Ankara, Turkey

Geliş Tarihi / Received: 29.03.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 26.05.2021

Özet: Zoonotik etkenlerin konakçı türlerinin belirlenmesi, ortaya çıkabilecek hastalıkların kontrol altına alınmasında oldukça önem arz eder. Yapılan çalışmalar, kemirgenlerin bakteriyel ve viral bulaşıcı mikroorganizmaların eko-epidemiolojisinde önemli rol oynadığı göstermiştir. Bunlar arasında kemirgenlerin doğal rezervuarları veya konakçıları olduğu *Bartonella* türleri de yer almaktadır. *Bartonella* spp. gibi göz ardı edilebilen patojenlerin izlenmesi ve epidemiyolojik çalışmalar yapılması önemlidir. Zoonotik özelliği ile halk sağlığı yönünden risk oluşturabilecek olan bu etkenin ülkemizde rodentlerde takibi göz ardı edilmiş veya çok az irdelenmiş durumdadır. Bu çalışmada, rodentlerde *Bartonella* spp.'nin Real-time PCR yöntemi ile araştırılması amaçlandı. Türkiye'nin beş farklı yerleşim biriminden kaplan ile yakalanan 41 rodente (ev faresi, lağım sıçanı, tarla faresi, kör fare) ait dalak örneğinde *Bartonella* spp. varlığı Real-time PCR ile araştırıldı. Real-time PCR sonucu incelenen rodent dalak örneklerinden 6'sı (%14,63) *Bartonella* spp. yönünden pozitif bulundu. *Bartonella* pozitifliği açısından örneklem lokasyonları arasında istatistiksel anlam saptanmadı ($P > 0,05$). Sonuç olarak, yabani kemirgenlerin hastalığın olası bulaşıcı rezervuar olarak önem arz ettikleri ve bu alanda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: *Bartonella* spp., Real-time PCR, rodent.

A common zoonotic agent in rodents: Bartonella

Abstract: Identifying the host types of zoonotic agents is one of the keys to controlling emerging infectious diseases. Studies have shown that rodents play an important role in the eco-epidemiology of bacterial and viral infectious agents. At the same time, rodents are natural reservoirs of *Bartonella* spp. It is important to monitor negligible pathogens such as *Bartonella* spp. especially in rodents that act as hosts and reservoirs, and to conduct epidemiological studies. This microorganism, which may pose a risk in terms of public health with its zoonotic feature, a limited number of studies have been conducted in our country on the detection of *Bartonella* spp. In this study, existence of *Bartonella* spp. was investigated by Real-time PCR method in 41 spleen samples of rodent (house mouse, field mouse, sewer rat, blind mouse) collected with trap from five different settlements of Turkey. A total number of six (14.63%) rodent spleen samples studied with the Real-time PCR were found positive for *Bartonella* spp. There was no statistical significance among sample locations in terms of *Bartonella* positivity. As a result of our study, it was concluded that wild rodent species can be considered as possible reservoirs in the transmission of the disease and further studies are needed in this area.

Keywords: *Bartonella* spp, Real time PCR, rodent.

Giriş

Bartonella spp, Proteobacteria sınıfı, *Bartonellaceae* ailesinin, *Bartonella* cinsi içerisinde yer almaktadır (Birtles ve Richard 2005). Etken, Gram negatif olup rutin boyalarla zayıf boyanmaktadır. *Bartonella* türleri aerobik üreyen, pleomorfik veya kokobasil yapıları fakültatif hücre içi bakterilerdir. *Bartonellaceae* familyasının, birçok memeli ve eklem bacaklılarda varlığını sürdürebilen bir bakteri grubunu temsil ettiği bilinmektedir (Birtles ve Richard 2005).

Bartonella türleri, kene, pire ve bit gibi vektörler tarafından taşınmakta ve kemirgenlerde, geviş getirenlerde, kedi ve köpek gibi birçok memeli türünde yaygın enfeksiyonlara yol açmaktadır (Diaz ve ark.

2012). Yapılan çalışmalarda, kemirgenler, kediler ve geviş getirenler olmak üzere *Bartonella* enfeksiyonları açısından birçok bildirim yapılmıştır. Kedilerde kronik böbrek yetmezliği, köpeklerde endokardit ve peliozis hepatitis (karaciğer lobüllerinde konjestiyon'a bağlı kan birikimleri) ve geviş getirelerde endokardit yaptığı bildirilmiştir (Chomel ve ark. 1996; Buffet ve ark. 2013; Breitschwerdt ve Kordick 2000; Chang ve ark. 2000; Kim ve ark. 2005).

İnsanlar enfeksiyonlar, *Bartonella* türlerini barındıran çeşitli kemirgenlerle temas veya ektoparazitlerine maruziyet sonrası ortaya çıkabilmektedir (Li 2015). *Bartonella* cinsi içerisinde *Bartonella* (*B.*) *henselae*, *B. bacilliformis*, *B. quintina*, *B. elizabethae*

ae, *B. vinsonii* ve *B. koehlerae* gibi türler insanlarda hastalık yapabilmektedir (Chomel 1995; Vayssier ve ark. 2009). Aynı zamanda yapılan çalışmalarda, insan lenfadenopati bakteriyel endokardit vakaları ve etiyojisi bilinmeyen ateşli hastalık vakalarında belirlenen *Bartonella* suşlarının eş zamanlı olarak, yabani kemirgenlerde belirlenmesi, bu vakaların olası bir kaynağı olduğunu öne sürmektedir. Bu bulgular, kemirgenlerle teması olan kişilerde, *Bartonella* spp. enfeksiyonlarının potansiyel kaynakları olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir (Malania, 2016).

Zoonotik *Bartonella* türlerinden, *B. henselae* insanlarda kedi tırnağı hastalığı; *B. bacilliformis*, Carrion Hastalığı ve *B. quintana*, siper ateşi hastalığına sebep olmaktadır (Avidor 2004; Diaz 2012). Bunların yanı sıra *Bartonella* türleri endokardit, miyokardit, ateş, splenomegali, lenfadenopati, nörolojik bozukluklar ve menenjit gibi hastalıklarla da ilişkilendirilmişlerdir (Kosoy ve ark. 2003).

Bartonella enfeksiyonlarının, bağışıklık sistemi baskılanmış kanser hastalarında, organ nakli yapılan bireylerde ve HIV hastalarında var olan klinik durumu daha da kötüye götürme ve şiddeti artırma ihtimali yüksektir (Koehler 1995). Bu nedenle, *Bartonella* spp. gibi zoonotik patojenlerin teşhiste göz ardı edilmesi, tedavi açısından olumsuzluklar oluşturabilir veya hayatı tehdit edici olabilir.

Bartonella enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı için, örneklerden bakteri izolasyonu, indirek floresan antikor testi (IFAT) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi yöntemler tercih edilmektedir (Çelebi 2008). *Bartonella* enfeksiyonların teşhisinde başvuru-

lanan kültür ve geleneksel PCR tekniklerinde karşılaşılan kontaminasyon ve yanlış pozitif sonuçlar sebebiyle, Real-time PCR yöntemi iyi bir tanı aracı olarak bilinmektedir. Real-time PCR, duyarlılık ve özgüllük, daha az kontaminasyon olasılığı ve genom kopya sayılarının ölçülmesi gibi avantajlar sağlamaktadır (Cievro 2005).

Bu çalışmada, halk sağlığı açısından tehdit oluşturabilecek *Bartonella* türlerinin, hastalığın bulaşında potansiyel konakçı ve/veya rezervuar görevi üstlenen rodentlerde varlığının Real-time PCR ile araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Çalışma materyali

Bu çalışmada, *Bartonella* türlerinin Real-time PCR ile araştırılması amacıyla toplam 41 rodent (ev faresi, lağım sıçanı, tarla faresi, kör fare) kullanıldı. Çalışmaya dahil edilen rodentler, Eylül 2011 ve Mayıs 2012 tarihleri arasında, Van, Ankara, Bursa, Yozgat, Sivas ve Zonguldak kırsalındaki farklı yerleşim birimlerinden toplandı (Şekil 1). Kapan kurularak toplanan yabani rodentler için, her bir yerleşim biriminde, sulak ve otlak alanlar, ağaçlık bölgeler, dere kenarları ve evlerin çevresi öncelikli yakalama alanı olarak tercih edildi. Aynı zamanda, farelerin yuva yapabileceği alanlar da göz önüne alınarak, toplamda 186 kapan kuruldu ve bir gece sonrası kapanlardaki rodentler toplandı. Toplanan rodentler, numune taşıma kapları ile soğuk zincir şartları altında laboratuvara ulaştırıldı. Rodentlerin nekropsileri yapılarak, dalak örnekleri steril numune kaplarına alındı. Örnekler analizleri yapılana kadar -80 °C'de saklandı.



Şekil 1. İncelenen rodent örneklerinin yerleşim birimlerine göre dağılımı.

DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için, 1×0.5×0.2-0.4 cm boyutundaki doku örnekleri, 500 µl fosfat tamponlu salin (PBS, pH 7.2) ile birlikte homojenize edildi. Rodent doku örneklerinin homojenizasyonu için Magnalys ser homojenizasyon cihazı (Roche, Rotkreuz, İsviçre) kullanıldı. Homojenize doku örneğinden 100 µl alındı ve doku ekstraksiyon kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak, üretici firma tarafından bildirilen talimatlar doğrultusunda DNA ekstraksiyonu yapıldı.

Real-time PCR

Rodent doku örneklerinden *Bartonella* türlerinin analizi, Diaz ve ark. (2012)'nin bildirdiği *ssrA* primer ve probe kullanılarak Real-time PCR eşliğinde gerçekleştirildi (Tablo 2).

Real-time PCR reaksiyonu, örnek başına 25 µl olacak şekilde; 12,5 µl Light Cycler probe master

miks (Roche, Mannheim, Almanya), 1 µl primer ve 1 µl prob, 5,5 µl distile su ve 5 µl ekstrakte DNA bileşenleri eşliğinde hazırlandı. Real-time PCR, LightCycler96 (Roche, Mannheim, Almanya) cihazında gerçekleştirildi ve ısı döngüsü, 95°C 5 dk ön denatürasyon, 40 döngüden oluşan ve 94 °C 20 sn denatürasyon, 60 °C 20 sn bağlanma, 72 °C 15 sn uzama, 72°C 10 dk son uzama olacak şekilde uygulandı. Real time PCR'de, RNase/ DNase ari su negatif kontrol olarak ve *B. henselae* (ATCC 49882) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Tüm örnekler ikili tekrar şeklinde analiz edildi. Analiz edilen örneklerde amplifikasyon eğrisi görülmeyenler veya Ct değeri (eşik değer sıklusu) 37'den fazla olanlar *Bartonella* yönünden negatif olarak kabul edildi. Negatif olan örnekler için sadece internal kontrol (IC) kanalında sonuçlar alındı. Ct ≤ 37'de belirgin logaritmik faz gösteren amplifikasyonlar ise pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 1. PCR yöntemi, hedef gen ve primer dizileri

Etken	Method	Primer /prob dizilimi
<i>Bartonella</i> spp.	Real- time PCR	Primer
		SsrA- F-GCTATGGTAATAAATGGACAATGAAATAA
		ssrA-R-GCTTCTGTTGCCAGGTG
	Prob	FAM-ACCCCGCTTAAACCTGCGACG-BHQ1

İstatistiksel analiz

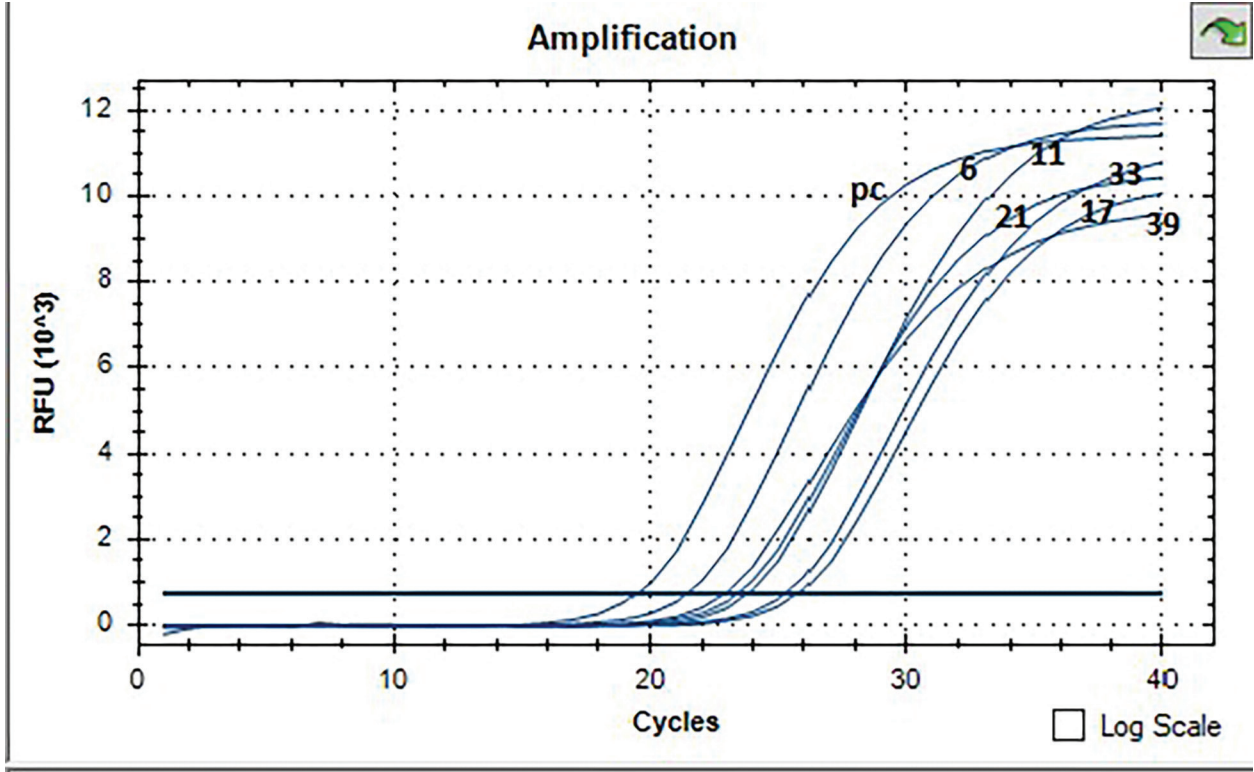
Verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS Statistic 22.0 programı ile gerçekleştirildi. Veriler % oran olarak ifade edildi ve iki değişkenin veri analizi Pearson Ki kare testi ile yapıldı.

Bulgular

Real-time PCR sonrası analiz edilen 41 rodent dalak örneğinin 6'sı (%14,63) *Bartonella* spp. yönünden pozitif saptandı. Belirgin logaritmik faz gösteren rodent örneklerinin, pozitif amplifikasyon eğrileri Şekil 2'de gösterilmiştir. PCR analizi ile pozitif saptanan örneklerin 2 (%4,87)'si Zonguldak, 3 (%7,31)'ü Bursa, 1 (%2,43)'i ise Sivas kırsalından toplanan rodentlere aittir (Tablo 3). *Bartonella* pozitifliği açısından örneklem lokasyonları arasında istatistiksel anlam saptanamamıştır (P > 0,05).

Tablo 2. Yerleşim birimlerine göre *Bartonella* spp. pozitif sonuçlar ve yüzde oranları.

Lokasyon	Örnek sayısı	Real-time PCR pozitif örnek sayısı	Pozitiflik % oran	P değeri
Sivas	9	1	%2,43	> 0,05
Yozgat	5	-	-	
Bursa	10	3	%7,31	
Ankara	10	-	-	
Van	3	-	-	
Zonguldak	4	2	%4,87	
Toplam		6	%14,63	



Şekil 2. *Bartonella* spp. pozitif rodent örneklerinin amplifikasyon eğrileri

Tartışma ve Sonuç

Zoonotik *Bartonella* türlerinden bazılarının (*B. elizabethae*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. grahamii*, *B. washoensis* ve *B. tribocorum*) kemirgen popülasyonları ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Vayssier ve ark. 2009; Kosoy 2010; Vijay 2012; Kandelaki ve ark. 2016). Günümüzde, kemirgen kaynaklı zoonotik hastalıklar açısından moleküler çalışmaların sayısının artırılması ve epidemiyolojik araştırmalarla desteklenmesi gerekmektedir. *Bartonella* spp. ile konakçıları arasında ilişkilerin açığa çıkarılması, hastalığın yeterince tanınabilmesi açısından bu tür çalışmalar önem arz etmektedir (Abbot ve ark. 2007). Bu çalışmada, sınırlı örneklem büyüklüğüne rağmen, *Bartonella* türlerine konakçılık veya rezervuarlık yaptığı bilinen rodentlerde etkenin moleküler prevalans araştırılmış ve yaygınlığı %14,63 olarak tespit edilmiştir. Dünyada *Bartonella* spp. varlığını belirlemeye yönelik yabani memelilerde birçok araştırma bulunmaktadır (Jardine ve ark. 2005; Brinkerhoff 2008; Abbot 2007; Karagöz ve ark. 2013, Çelebi ve ark. 2015).

Karagöz ve ark. (2013), İç Anadolu Bölgesi'nde kültür ve PCR yöntemi ile tarla farelerinde total *Bartonella* spp. pozitifliğini %57,1 olarak bildirmiştir. Çelebi ve ark. (2015), Batı Karadeniz Bölgesinde

yaptıkları moleküler bir çalışmada, *Bartonella* pozitifliğini yabani rodentlerde %63,6 olarak belirlemişlerdir. Söz konusu araştırmacıların örnekleri topladığı coğrafi bölgeler göz önüne alındığında, ılıman iklimle sahip olan bu tür bölgelerde yüksek *Bartonella* pozitifliğinin saptanabileceği öngörülmektedir. Bu çalışmada *Bartonella* spp.'nin moleküler prevalansının daha düşük olmasının nedenleri net değildir. Fakat, çalışma alanlarının dağınıklığı, ekolojik olarak farklı bölgelerden örnek toplanması ve örneklenen hayvanların habitatları etkenin potansiyel vektör ve konakçı türlerinin farklılığı temel nedenler olarak sayılabilir. Aynı şekilde, ılıman ve yağışlı iklime sahip Zonguldak ve Bursa kırsalından toplanan rodent örneklerinde, diğer yerleşim birimlerine kıyasla çok daha yüksek pozitiflik elde edilmesi, bu öngörüye doğrulamaktadır.

Memelilerde saptanan *Bartonella* enfeksiyonları, etkenin bulaştırılmasında önemli rol oynayan vektör yoğunluğuna bağlı olarak değişebilmektedir (Chomel ve ark. 1995). Sığırcı ve İlğaz tarafından (2013), kedilerde *B. henselae* prevalansı kültür yöntemi araştırılmış ve 16S-23S rRNA interjenik bölge sekansı ile tür identifikasyon gerçekleştirilmiştir. Pire istilası olan kedilerde prevalansı %37,5 (48/18) be-

irlenirken, pire enfestasyonu olmayan kedilerde bu oran %18,8 (48/9) olarak saptanmıştır. Araştırmacılar, örneklerin toplanma zamanlarındaki mevsimsel farklılıklara ve dönemsel pire enfestasyonlarına paralel olarak oluşan bakteriyemi durumuna dikkat çekmişlerdir. Buna paralel olarak bu çalışmada, ılıman iklimli yerleşim birimlerinde örneklenen rodentlerde saptanan yüksek pozitiflik, rodentlerde vektörel enfestasyonları akla getirmiştir. Aynı zamanda, avlanan kediler kemirgenlerin yakalanması veya yutulması sırasında üzerindeki çeşitli vektörlere (pire vb) maruz kalabilirler (Castle ve ark. 2004, Kamani ve ark. 2013). Bu şekilde gerçekleşebilecek rodent kaynaklı bulaşma senaryoları, kemirgen-kedi-insan döngüsü araştırılarak açıklığa kavuşabilir (Gutiérrez 2015; Kevin ve ark. 2004). *Bartonella* spp. etkeninin aktarımında rol oynayan vektörlerin, iklime bağlı olarak çoğalma yeteneklerinin değişebilmesinden dolayı, konakçı-vektör-bakteriyemi ilişkisini gözlemleyebileceğimiz çalışma modellerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bartonella spp'nin kültürel yöntemlerle teşhisinde, etkenin fakültatif intrasellüler oluşu ve *in vitro* kültürünün zor olmasına bağlı olarak çeşitli aksaklıklarla karşılaşmaktadır. Ayrıca etkenin bu yöntemlerle tanımlanması bazen haftalarca sürebilmektedir (Diaz 2012). Günümüzde *Bartonella* spp'nin konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmasında karşılaşılan güçlükler sebebiyle, moleküler yöntemler teşhiste önem kazanmıştır (Çelebi 2008; Polat 2010). Bu çalışmada rodent doku örneklerinden *Bartonella* spp'nin teşhisi, Real-time PCR ile kısa zamanda ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde, hayvanlar ve insanlara yönelik potansiyel bir tehdit oluşturan *Bartonella* etkenlerinin tespitinde, diğer çalışmalara benzer şekilde Real-time PCR'nin veterinerlik ve halk sağlığı alanında etkili bir diagnostik yöntem olabileceği belirlenmiştir.

Çalışma sonuçları, *Bartonella* spp. pozitif kemirgenlerin, Bartonellozun bulaşmasında rol alabileceğini düşündürmüştür. *Bartonella* türlerinin, bulaşıcı zoonoz etkenler olarak, farklı coğrafi birimlerde, kırsal ve kentsel alanlarda kemirgenler arasındaki yaygınlığı önemli halk sağlığı problemleri oluşturabilmektedir. Hastalığın ekolojik döngüsüne katkısı olan rodentler de dahil olası tüm konak türleriyle ilgili yapılacak bu tür çalışmaların koruma kontrol uygulamaları açısından fayda sağlayacağı umulmaktadır.

Deney hayvanlarının kullanımına ilişkin Etik Kurul, diğer etik kurul kararları ve izinleri: Bu çalışma, TC. Tarım ve Orman Bakanlığı, Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yerel Etik Kurulu tarafından 2011/4 sayılı ve 19.07.2011 tarihli

izin ile onaylanmıştır. Doğal ve Milli parklar Genel Müdürlüğü tarafından 26.08.2011 tarih ve 8726 sayılı yazı ile araştırma izin belgesi düzenlenmiştir.

Çıkar çatışması: Çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

- Abbot P, Aviles AE, Eller L, Durden LA (2007). Mixed infections, cryptic diversity, and vector-borne pathogens: Evidence from *Polygenis* fleas and *Bartonella* species. *Appl Environ Microbiol*, 73,6045–6052.
- Avidor B, Graidy M, Efrat G, Leibowitz C, Shapira G, Schattner A, Zimhony O, Giladi M *Bartonella* infections. *Koehler JE* (1996). *Adv Pediatr Infect Dis*, 11,1-27.
- Birtles J Richard J (2005). *Bartonellae* as elegant hemotropic parasites. *Ann N Y Acad Sci*, 1063,270-9. doi: 10.1196/annals.1355.044.
- Breitschwerdt EB, Kordick DL (2000). *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin Microbiol Rev*, 13,3, 428-38.
- Brinkerhoff RJ (2008). Mammal and Flea Occurrence in Association with Black-Tailed Prairie Dog (*Cynomys Ludovicianus*) Colonies: Implications for Interspecific Plague Transmission. Ph.D. Dissertation University of Colorado, Boulder, Colorado, USA.
- Buffet JP, Kosoy M, Vayssier TM (2013). Natural history of *Bartonella*-infecting rodents in light of new knowledge on genomics, diversity and evolution. *Future Microbiol*, 8,1117–1128.
- Castle KT, Kosoy M, Lerdthusnee K, Phelan L, et al. (2004). Prevalence and diversity of *Bartonella* in rodents of northern Thailand: A comparison with *Bartonella* in rodents from southern China. *Am J Trop Med Hyg*, 70:429–433
- Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Heller RM, Kocan KM, Ueno H, Yamamoto K, Bleich VC, Pierce BM, Gonzales BJ, Swift PK, Boyce WM, Jang SS, Boulouis HJ, Piémont Y (2000). *Bartonella* spp. isolated from wild and domestic ruminants in North America. *Emerg Infect Dis*, 6,3,306-11
- Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, Gurfield AN, Abbott RC, Pedersen NC, Koehler JE (1996). Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol*, 34,8, 1952-6.
- Chomel BB, R C Abbott, R W Kasten, K A Floyd-Hawkins, P H Kass, C A Glaser, N C Pedersen, J E Koehler (1995). *J Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *Clin Microbiol*, 33(9),2445-50. doi: 10.1128/JCM.33.9.2445-2450.1995.
- Ciervo A, Mastroianni CM, Ajassa C, Pinto A, Ciceroni L (2008). Rapid identification of *Bartonella henselae* by real-time polymerase chain reaction in a patient with cat scratch disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 53(1):75-7.
- Çelebi B (2008). *Bartonella henselae* and its infections. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 42,1, 163.
- Çelebi B, Karagöz A, Öktem M A, Çarhan A, Matur F, Özkazanç NK, Babür C , Kılıç S , Sözen M , Karataş A, Durmaz R (2015). *Bartonella* species in wild small mammals in Western Black Sea Region of Turkey . *Journal of Ankara University Faculty Medicine*, 62, 3, 183 – 187. doi: 10.3201/eid1804.110816
- Diaz MH, Bai Y, Malania L, Winchell JM, Kosoy MY (2012). Development of a novel genus specific real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bartonella* species and genotypes. *J Clin Microbiol*, 50,5, 1645-9.

- Gutiérrez R, Krasnov B, Morick D, Gottlieb Y, Khokhlova IS, Harrus S (2015). *Bartonella* Infection in Rodents and Their Flea Ectoparasites: An Overview. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 1, 15(1), 27–39.
- Jardine C, Appleyard G, Kosoy MY, McColl D, Chirino-Trejo M, Wobeser G, Leighton FA (2005). Rodent-associated *Bartonella* in Saskatchewan. *Canada Vector Borne Zoonotic Dis*, 5,4, 402–9. doi: 10.1089/vbz.2005.5.402.
- Kamani J, Morick D, Mumcuoglu K, Harrus S (2013). Prevalence and Diversity of *Bartonella* Species in Commensal Rodents and Ectoparasites from Nigeria, West Africa. *PLOS Neglected Tropical Dis*, 7,5. doi: 10.1371/journal.pntd.0002246.
- Kandelaki G, Malania L, Bai Y, Chakvetadze N, Katsitadze G, Imnadze P, Nelson C, Harrus S (2016). Human Lymphadenopathy Caused by Ratborne *Bartonella*, Tbilisi, Georgia. *Emerg Infect Dis*, 22, 1 – 3. doi: 10.3201/eid2203.151823.
- Karagöz A, Çelebi B, Şimsek, H, Taner, M, Kılıç S, Durmaz R, Ertek M (2013). Detection of *Bartonella* spp. in field mice (*Microtus socialis*) by culture and PCR. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 60, 235–239.
- Kevin C, Kosoy M, Lerdthusnee K, Phelan L, Bai Y, Gage K, Iepitakrat W, Monkanna T, Khlaimanee N, Chandranoi K, Jones J, Coleman R (2004). Prevalence and diversity of *Bartonella* in rodents of northern Thailand: a comparison with *Bartonella* in rodents from southern China. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 70(4),429–33. doi: 10.4269/ajtmh.2004.70.429.
- Koehler J E (1995) *Bartonella*-associated infections in HIV-infected patients *AIDS. Clin Care*, 7(12),97–102.
- Kosoy M (2010). Ecological associations between bacteria of the genus *Bartonella* and mammals. *Biol. Bull*, 37, 716–724.
- Kosoy M, Hayman DT, Chan KS (2003). *Bartonella* bacteria in nature: where does population variability end and a species start? *Infect Genet Evol*, 12, 894–904.
- Li D-M, Hou Y, Song X-P, Fu Y-Q, Li G-C, Li M, Eremeeva ME, Wu H-X, Pang B, Yue Y-J, Huang Y, Lu L, Wang J, Liu Q-Y (2015). High prevalence and genetic heterogeneity of rodent-borne *Bartonella* species on Heixiazi Island, China. *Appl Environ Microbiol*, 81,7981–92.
- Malania L, Bai Y, Osikowicz LM, Tsertsvadze N, Katsitadze G, Imnadze P, Kosoy M (2016). Prevalence and Diversity of *Bartonella* Species in Rodents from Georgia (Caucasus). *Am J Trop Med Hyg*, 3,95(2),466–471.
- Polat M, Parlak AH (2010). Infections Caused by *Bartonella*. *Turkiye Klinikleri J Dermatol- Special Topics*, 3,3,56–64.
- Siğirci BD, Ilgaz A (2013). Detection of the Presence of *Bartonella henselae* in Cats in Istanbul. *Journal of The Faculty of Veterinary Medicine Istanbul University*, 39, 2, 209 – 217.
- Vayssier TM, Rhun D Le, Bonnet S, V Cotte (2009). Insights in *Bartonella* host specificity. *Ann N Y Acad Sci*, 1166, 127 – 132. doi: 10.1111 / j.1749-6632.2009.04531.x.
- Vijay G, Billeter SA, Rood MP, Kosoy M (2012). *Bartonella* spp. in Rats and Zoonoses, *Emerg Infect Dis*, 18,4, 631–633.



***Lactobacillus buchneri*'nin silajdaki eşsiz etkinliği**

Mustafa Öno1* , İmge Duru Öno2 

¹ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 29.09.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 17.03.2021

Özet: Silajın daha iyi korunmasını sağlamak ve geliştirmek için çeşitli katkı maddeleri mevcuttur. Bu silaj katkıları içinde en yaygın kullanıma sahip olanlardan biri de laktik asit bakterilerini içeren mikrobiyal inokulantlardır. Havaya maruz kaldıktan sonra birkaç gün boyunca şaşırıcı şekilde sıcaklığı artmayan (aerobik kararlılık gösteren) mısır silajlarından izole edilen *Lactobacillus buchneri* bakterilerinin inokulant olarak silajlarda kullanımına ilişkin çalışmalar bu alanda son 20 yılda en ilgi çeken konulardan biri olmuştur. Günümüzde *L. buchneri*, silaj inokulantlarında kullanılan ana heterofermantatif laktik bakteridir. Bu bakteri laktik asidi asetik aside ve diğer ürünlere dönüştürebilir. Asetik asit, silajların ısınmasına ve bozulmasına neden olan mayaların ve küflerin iyi bir inhibitörüdür. Böylece *L. buchneri* silajın aerobik stabilitesini, başka bir deyişle silo ve yemlik ömrünü artırır. Bu derlemede, *L. buchneri*'nin silaj açısından öne çıkan temel özellikleri, silajın korunmasında sağladığı olumlu etkiyi oluşturma şekli ve silajda inokulant olarak kullanımında etkinliğini etkileyen etmenler hakkında bilgi vermektedir.

Anahtar kelimeler: Aerobik stabilite, *Lactobacillus buchneri*, Silaj

The unique activity of *Lactobacillus buchneri* in silage

Abstract: A variety of additives are available to improve ensiling and to provide better protection for silage. Microbial inoculants containing lactic acid bacteria are the most widely used among these silage additives. Studies on the use of *Lactobacillus buchneri* bacteria as inoculant in silages, isolated from maize silages, whose temperature does not increase surprisingly for several days after exposure to air (indicating aerobic stability), has been one of the most interesting topics in this field over the last two decades. Today, *L. buchneri* is the main heterofermentative lactic acid bacteria used in silage inoculants. These bacteria can convert lactic acid into acetic acid and other products. Acetic acid is a good inhibitor of yeasts and molds that result in heating and spoiling of silage. In this way, *L. buchneri* increases the aerobic stability of silage, in other words, life of silo and feeder. This review gives information about the prominent characteristics of *L. buchneri* in terms of silage, the way it develops the positive effect in the preservation of silage, and the factors affecting its effectiveness when used as an inoculant in silage.

Keywords: Aerobic stability, *Lactobacillus buchneri*, Silage

Giriş

Bitki yüzeylerinde, bitkilerin doğal yapısında olduğu gösterilmiş olan belirli türlerde laktik asit bakterileri bulunur. Silaj yapımı temelde bu epifitik laktik asit bakterilerine bağlıdır. Laktik asit bakterilerinin bitkiler üzerindeki rolü tam bilinmemekle birlikte hasarlı bitki kısımlarında, hasarlı olmayan bitki kısımlarından daha fazla sayıda bulunmalarından dolayı bitkileri istenmeyen mikroorganizmalardan (organik asitler, bakteriyosinler ve antifungal ajanlar gibi antagonistik bileşikler üreterek) korudukları veya çoğalmalarını sınırladıkları düşünülmektedir. Silolama sürecinde ise homofermantatif laktik asit üreten (*Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Pediococcus* türlerini içeren) bakteriler pH'yı düşürerek bozulmaya neden olan mikroorganizmaları baskılar (Holzer ve ark. 2003).

Silaj havaya (oksijene) maruz kaldığında, bazı fırsatçı mikroorganizmalar metabolik olarak aktif hale gelir, ısı üretir ve silajdaki besinleri (en başta laktik asidi) tüketerek bozulmaya neden olur. *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* ve *Pichia* gibi laktat asimile eden mayalar (laktik asidi hızla karbondioksit ve suya metabolize ettiği için) silajlarda aerobik bozulmanın birincil nedeni olarak gösterilmiştir. Ancak daha az ölçüde küfler, basiller, asetik asit bakterileri ve muhtemelen laktik asit bakterileri de bozulmada rol oynar. Bu nedenle homofermantatif laktik asit bakterilerinin silajdaki koruyucu etkinliği kalıcı değildir (Woolford, 1990).

Silolamanın ilerleyen aşamalarında mikrobiyal çeşitliliğin değişmesi (özellikle farklı laktik asit bakteri türlerinin, Tablo 1), farklı türlerin birbirinin yerine

geçmesi, fermantasyon dönemi boyunca gelişen ve değişen dinamik bir süreçtir (Drouin ve ark. 2019). Bitki materyali silaj yapımı için hasat edildikten, sıkıştırıldıktan ve hava almayacak şekilde kapatıldıktan sonra başlayan anaerob fermantasyon sürecinde zamana bağlı olarak baskın olan bakteri türleri farklılaşmaktadır. Heterofermentatif laktik asit bakterileri, silajdaki laktik asit bakterilerinin baskın grubudur. Silolama periyodunun dördüncü gününden sonra

fermentasyon süreci ilerledikçe mikrobiyotada baskınlık *L. brevis*, *L. plantarum* ve özellikle *L. buchneri*'ye doğru kayar (Holzer ve ark. 2003).

Bu derlemenin amacı, *L. buchneri*'nin silaj açısından öne çıkan temel özellikleri, silajın korunmasında sağladığı olumlu etkiyi nasıl oluşturduğu ve silajda inokulant olarak kullanımı sırasında etkinliğini etkileyen faktörler hakkında bilgi vermektedir.

Tablo 1. Silajda sık bulunan *Lactobacillus* cinsi homo- ve heterofermentatif laktik asit bakterileri (Holzer ve ark. 2003)

Laktik asit bakterileri	Baskın fermente etme özellikleri	Türler
Grup I: Obligat (zorunlu) homofermentatifler	Bu türler, heksozları Embden-Meyerhof yoluyla laktik aside dönüştürür, ancak pentozları veya glukonati fermente edemez.	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. farciminis</i> <i>L. lactis</i> <i>L. bovis</i>
Grup II: Fakültatif heterofermentatifler	Bu mikroorganizmalar genellikle heksozları homofermentatif olarak laktik aside fermente eder, ancak özel koşullar altında laktik asitten heterofermentatif metabolizma ile karbondioksit ve etanol (veya asetik asit) meydana gelir. Asetik asit üretimi, örneğin fruktoz veya moleküler oksijenin azaltılması yoluyla, NAD+'nin etanol oluşmadan rejeneri edilebildiği koşullar altında meydana gelir. Pentozlar, fosfoketolaz yoluyla laktik ve asetik aside fermente edilir.	<i>L. alimentarius</i> <i>L. casei</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. sakei</i> <i>L. paralimentarius</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. pentosus</i>
Grup III: Obligat (zorunlu) heterofermentatifler	Heksozlar laktik asit, karbon dioksit ve etanole (veya alternatif bir elektron alıcısı varlığında asetik aside) fermente edilir. Pentozlar, laktik ve asetik aside dönüştürülür.	<i>L. buchneri</i> <i>L. brevis</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. fructivorans</i> <i>L. sanfranciscensis</i>

***Lactobacillus buchneri*'nin temel özellikleri**

Henneberg tarafından ilk kez 1903 yılında *Bacillus buchneri* olarak bildirilen *L. buchneri*, gram pozitif, spor oluşturmeyen, anaerobik, çubuk prokaryot ve zorunlu heterofermentatif bir bakteridir. *L. buchneri* düşük ısıya duyarlıdır ve yavaş çoğalır (Vos ve ark. 2009). İnsan bağırsağı, domuz dışkısı, rumen sıvısı, biyoetanol işleme artıkları, turşu suyu, fermente salatalık, filtresiz malt bira ve silajdan izole edilmiştir (Tanizawa ve ark. 2020).

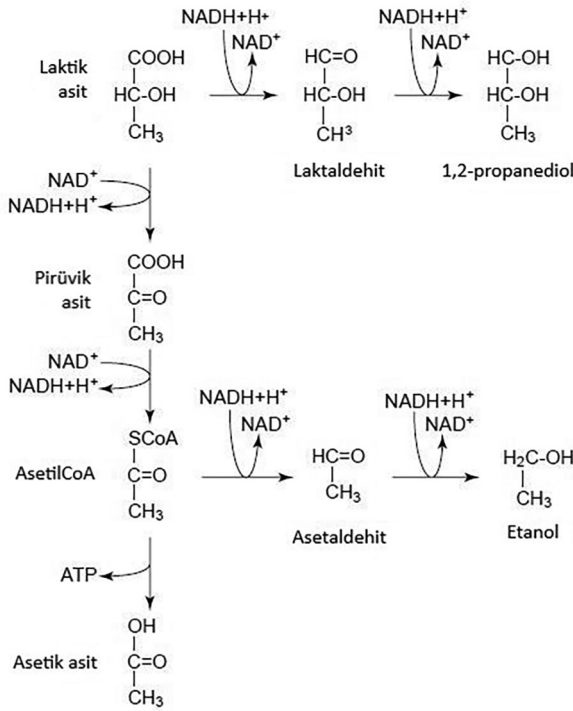
Silaj açısından *L. buchneri*'nin temel özellikleri ise (1) Laktik asidi anaerobik yıkımlaması, (2) Ferulik asit esteraz (FAE) ile (3) Bakteriyosin üretmesidir.

(1) *L. buchneri* fermantasyon süreci sırasında hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında laktik asit ve diğer metabolitlerle birlikte bozulma mikroorganizmalarını baskılayıcı aktiviteye sahip asetik asit üretir (Danner ve ark. 2003; Eikmeyer ve ark. 2015). Anaerobik ve asidik koşullar altında laktik asidi asetik asit, etanol ve 1,2-propandiole dönüştürebilen *L. buchneri*'nin hücre canlılığının korunmasına katkıda

bulunan bu metabolik yol Şekil 1'de gösterilmiştir (Oude Elferink ve ark. 2001).

Asetik asit oluşumunu sağlama *L. buchneri*'yi silaj fermantasyonunu geliştirmek ve küf ile mayaların neden olduğu aerobik bozulmayı ve ısınmayı önlemek için çoğu çiftlikte yararlı bir inokulant haline getirmektedir. Buna karşılık, *L. buchneri* salatalık turşularının korunma süreci açısından zararlı ve bira üretiminde kirletici (kontaminant) olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle *L. buchneri*, ekonomik ve hijyenik açıdan önemli bir gıda starteri veya bir gıda bozucusu olarak birbirine zıt aktiviteler sergiler (Tanizawa ve ark. 2020).

L. buchneri, 1,2-propandiolü propanol ve propiyonik aside metabolize edememekte, silajda bulunan *L. diolivorans* ve *L. reuteri* gibi *Lactobacillus*'lar bu dönüşümü yapmaktadır (Muck ve ark. 2018). Fakat yeni tür *L. buchneri* A KKP 2047 p'nin de laboratuvar koşullarında 1,2-propandiolü propiyonik aside metabolize edebildiği bildirilmiştir (Zielinska ve ark. 2017).



Şekil 1. *Lactobacillus buchneri*'nin laktik asidi asetik asit ve 1,2-propandiole anaerobik yıkımlama yolu (Oude Elferink ve ark. 2001)

(2) Asetik asit üretebilmenin yanı sıra bazı *L. buchneri* suşları, FAE üretebilme kapasitesi ile silajda lif sindirilebilirliğini artırma potansiyeli de taşır (Nsereko ve ark. 2008; Kang ve ark. 2009; Muck ve ark. 2018) Ferulik asit, bitki hücre duvarındaki lignin ve hemiselüloz arasındaki şekerlerle feruloil ester bağlarını oluşturur. FAE, kaba yem sindirilebilirliğinin birincil sınırlayıcı faktörlerinden biri olan bitki hücre duvarından ferulik asidin ayrılmasını sağlar ve böylece doğrudan lif sindirimini, başka bir deyişle bitki hücre duvarının selüloolitik veya ksilanatik hidrolize duyarlılığını artırır (Nsereko ve ark. 2008; Kang ve ark. 2009; Raffrenato ve ark. 2017).

Silaja inokule edilen *L. buchneri*'nin *in vitro* lif sindirilebilirliği üzerindeki etkileri ise tutarsız olmuştur (Kang ve ark. 2009; Comino ve ark. 2014; Muck ve ark. 2018). İstenilen etkiyi yaratmadaki bu tutarsızlık, silajda FAE'in etkinlik koşullarının her zaman sağlanamaması, ortamda yeterli miktarlarının bulunmaması ve *L. buchneri*'nin FAE sentezleme kabiliyetine (suşuna) bağlı olabilir (Muck ve ark. 2018).

(3) *L. buchneri*'nin bir diğer özelliği, patojenler de dahil olmak üzere bazı gram pozitif bakterilerin büyümesini engelleyen antibakteriyel peptid buchnerinin LB'yi üretebilme yeteneğine sahip olmasıdır.

Buchnerinin LB, test edilen farklı bakteri (*Listeria*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus*) türlerine karşı geniş bir inhibitör spektruma sahiptir (Yıldırım ve Yıldırım 2001, Yıldırım ve ark. 2002)

Aerobik olarak bozulmuş silajlarda gerçekleşebilen *Clostridia* sınıfı bakterilerin çoğalması riski *L. buchneri* inokulasyonu ile aerobik stabilite iyileştirilerek azaltılabilir (Tabacco ve ark. 2009). Silaj yapımı sırasındaki hatalar, fermantasyon yetersizliği ve yemleme yönetimi eksiklikleri sonucu silajda bulunabilecek patojen *Escherichia coli* (özellikle *E. coli* O157: H7) ve *Listeria monocytogenes*'e karşı *L. buchneri*'nin tek başına veya kombine inokulasyonu; sağladığı pH, asetik asit artışı ve bakteriyosin(ler) ile bu bakteriler üzerinde önemli bir baskılanma oluşturmuştur (Queiroz ve ark. 2018).

***Lactobacillus buchneri*'nin silajın bozulmasını geciktirmesi**

Birçok çiftlikte, silaj genellikle yemlemeden önce ve yemleme sırasında değişen düzeylerde aerobik bozulmaya maruz kalır. Örneğin, silolardan her öğün yeterli miktarda silajın çıkarılmaması, silajın iyi sıkıştırılmaması veya örtülmemesi/paketlenmemesi yemlemeden önce silajların bozulmasının yaygın nedenleridir. İşgücünü azaltmak için bazı üreticiler sadece her iki veya üç günde bir yemleme yaparak düveleri ve besi sığırlarını beslemeyi seçtiğinde veya silaj kamyonlarla satın alındığında ve taşındığında birkaç gün boyunca açıkta havaya maruz kalır. Bu gibi nedenlerle aerobik bozulmaya uğramış silajlarda kuru madde kaybı artar, besin madde değerleri düşer, bozulan silajı tüketen hayvanların verimi ve sağlığı (mikotoksin üreten küflerin veya patojenlerin gelişimi sonucu) olumsuz etkilenir ve bozuk silajdan çıkan gazlar ile bozuk kısımlarının atılması çevreye zarar verir. (Driehuis ve Oude Elferink 2000; Ranjit ve Kung 2000). Bozulmuş silaj, besin kaybına uğradığı ve bu silajla beslenen hayvanlar daha az verimli olduğu için net çiftlik gelirinde düşüğe neden olur. Bu nedenle, silajların aerobik stabilitesini iyileştirmek, üreticilere ekonomik açıdan önemli artılar sağlayabilir (Kleinschmit ve Kung 2006).

Silolama/saklama ve yemleme sırasında havaya maruz kalma, silajlarda bozulmanın hızla başlamasına neden olur. Silajda bozulmanın birincil başlatıcıları olan ve laktik asidi metabolize edebilen mayalar, silaj pH'sında artışa yol açar. Silaj ortamındaki bu temel değişiklikler, fırsatçı bakteri ve mantarların da çoğalmasına yol açarak daha fazla bozulmaya neden olur (Woolford, 1990).

Çoğu bakteriyel silaj inokulantları, fermantasyon işlemi sırasında öncelikle laktik asit üretir. Silaj inokulantlarında kullanılan en yaygın laktik asit üreten bakteriler *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *Pediococcus cerevisiae*, *P. acidilactici* ve *Enterococcus faecium*'dur. Bu bakterilerin fermantasyon sırasında pH düşüşünü arttırdığı, silaj kuru madde kayıplarını azalttığı ve birçok durumda hayvan performansını arttırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, homofermantatif bakteriyel inokulantlar tarafından üretilen silaj fermantasyon ürünleri, bazen silaj havaya maruz kaldığında inokulasyon yapılmamış silajlardan daha az stabil olan silaja neden olabilir. Çünkü homofermantatif bakteriler tarafından üretilen laktik asit, havaya maruz kalan silajda hızla çoğalan laktat asimile edici bazı maya ve küf türleri tarafından kolayca metabolize edilir (Combs ve Hoffman 2001).

Silolamada istenilen fermantasyonu kontrol etmek (laktik asidin hızlı üretimini ve bunun sonucunda pH'daki daha hızlı ve fazla azalmayı sağlamak) için kullanılan homofermantatif inokulantlar, mısır silajlarının aerobik bozulmasını arttırır (Muck 2004). Çünkü bu fermantasyonlarda silajı aerobik bozulma mikroorganizmalarına karşı korumak için yeterli uçucu yağ asidi (özellikle asetik asit) üretilmez (Moon 1983). Bu noktadan hareketle Muck (1996), *L. buchneri* inokule edilmesinin silajlar havaya maruz kaldıklarında bozulmayı geciktirebileceğini (aerobik stabilitenin artabileceğini) öne süren ilk kişidir.

Mısır silajlarına inokule edilen *L. buchneri*'nin oluşturduğu ana değişiklikler aşağıda sıralanmıştır:

a) Laktik asit azalışı ve asetik asit artışı (Driehuis ve ark. 1999; Filya 2003; 2006; Nishino ve ark. 2003; 2004; Kleinschmit ve ark. 2005; Kleinschmit ve Kung 2006; Hu ve ark. 2009; Kristensen ve ark. 2010; Schmidt ve Kung 2010; Queiroz ve ark. 2013; Drouin ve ark. 2019)

b) Laktik asitin asetik asite oranında düşme (Ranjit ve Kung 2000; Kleinschmit ve ark. 2005; Kang ve ark. 2009; Kristensen ve ark. 2010; Tabacco ve ark. 2011; Queiroz ve ark. 2013; Drouin ve ark. 2019)

c) 1,2-Propanediol artışı (Driehuis ve ark. 1999; Nishino ve ark. 2003; 2004; Hu ve ark. 2009; Mari ve ark. 2009; Kristensen ve ark. 2010; Schmidt ve Kung 2010)

d) Etanol artışı (Nishino ve ark. 2003; Filya ve ark. 2006; Kleinschmit ve ark. 2005; Hu ve ark. 2009; Kang ve ark. 2009; Schmidt ve Kung 2010)

e) Final pH'da artış (Driehuis ve ark. 1999; Ranjit ve Kung 2000; Filya 2003; 2006; Nishino ve ark. 2003;

2004; Kleinschmit ve Kung 2006; Hu ve ark. 2009; Kristensen ve ark. 2010; Schmidt ve Kung 2010)

f) Maya sayısında azalma (Driehuis ve ark. 1999; Ranjit ve Kung 2000; Filya ve ark. 2006; Kleinschmit ve ark. 2005; Kleinschmit ve Kung 2006; Hu ve ark. 2009; Kristensen ve ark. 2010; Schmidt ve Kung 2010; Tabacco ve ark. 2011)

g) Aerobik stabilite artışı (Driehuis ve ark. 1999; Ranjit ve Kung 2000; Filya 2003; 2006; Nishino ve ark. 2004; Kleinschmit ve ark. 2005; Kleinschmit ve Kung 2006; Hu ve ark. 2009; Kang ve ark. 2009; Mari ve ark. 2009; Kristensen ve ark. 2010; Schmidt ve Kung 2010; Tabacco ve ark. 2011; Queiroz ve ark. 2013)

h) Kuru madde kaybında artış (Driehuis ve ark. 1999; Filya 2003; 2006; Nishino ve ark. 2003; Kleinschmit ve Kung 2006; Hu ve ark. 2009)

L. buchneri inokule edilmiş mısır silajlarında laktat ve asetat konsantrasyonlarında oluşan farklılıklar, hem bakteri hem de mantar popülasyonlarını etkiler ve fermantasyon sürecinde farklı etmenlere de bağlı olarak silaj mikrobiyal popülasyon çeşitliliğinde spesifik değişiklikler oluşturur (Drouin ve ark. 2019).

Aktif fermantasyon sırasında laktik asit ve daha sonra laktik asitten bir miktar asetik asit üreten *L. buchneri*'nin silajın korunmasındaki temel rolü, silajda sağladığı asetik asit artışı ile bazı mayaların çoğalmasını baskılaması ve silajların aerobik stabilitesini (yedirmek için açıldığında oksijene maruz kalan silajın ısınmaya karşı gösterdiği direnci süre açısından) arttırması, diğer bir anlatımla silajın bozulmasını geciktirmesidir (Combs ve Hoffman 2001; Borreani ve ark. 2018).

L. buchneri inokule edilmiş silajdaki maya ve küf çoğalması, inokulasyon yapılmamış silajlara göre silajın açılması sonrası daha düşük olmaktadır. Sonuçta, silaj havaya maruz kaldığında *L. buchneri* inokule edilen silajın sıcaklığı kolayca yükselmez ve sıcak havalarda bile birkaç gün boyunca ortam sıcaklığına benzer olma eğilimini korur (Combs ve Hoffman 2001).

Aerobik stabilite, 23±1°C'lik bir odada havaya maruz kaldıktan sonra silaj kütlelerinin sıcaklığının 2°C artmasına kadar geçen süre (saat) olarak tanımlanır. Mısır silajına *L. buchneri* inokulasyonu aerobik stabiliteyi silolamanın 8-9. ayında 46 saatten 76 saate (Mari ve ark. 2009) ve silolamanın 120. gününde 27 saatten 44 saate (Queiroz ve ark. 2013), yine silolamanın 120. gününde 44 saatten 136 saate (Schmidt ve Kung 2010) çıkartmıştır.

Silajın aerobik olarak stabil olması durumunda *L. buchneri*'nin heterofermantatif fermantasyonuna bağlı olarak silaj kuru madde kaybı (yaklaşık %1-2), aslında *L. buchneri*'yi homofermantatif bakteriyel inokulantlara göre daha az arzu edilen bir silaj inokulantı yapabilir (Contreras-Govea ve Muck 2006; Kleinschmit ve Kung 2006; Borreani ve ark. 2018). Ancak uzun süreli depolama ve yemleme sırasında silajın aerobik stabilitesindeki iyileşmeler daha faydalıdır ve bu nedenle heterofermantasyondan kaynaklanan düşük kuru madde kayıpları daha az önemli hale gelir (Nishino ve ark. 2003; Borreani ve ark. 2018; Muck ve ark. 2018). Heterolaktik fermantasyondan kaynaklanan kuru madde kayıpları ile daha yüksek asetik asit düzeylerinin yem tüketimi üzerindeki olumsuz etkilerine ilişkin endişelerin ise yersiz olduğu kanıtlanmıştır (Muck ve ark. 2018).

Silaj inokulantı olarak *Lactobacillus buchneri*'nin etkinliğini etkileyen etmenler

L. buchneri'nin ne zaman en etkili olacağı konusunda temel yaklaşım, silajda zayıf aerobik stabilite ile ilgili sorunların beklendiği koşullar altında *L. buchneri* inokulasyonunun faydalı olacağıdır. Bunlar yanında, inokulant olarak kullanımı sırasında dikkat edilmesi gereken noktalar da *L. buchneri*'nin etkinliğini değiştirebilir (Combs ve Hoffman 2001; Web 2020).

(a) Silajda aerobik stabilite sorunlarına yol açabilecek etmenler

- **Silo tipi:** Geniş açık yüzeylere sahip toprak üzeri basit (yığın) silolar, yan duvarları beton silolar, hendek (çukur) silolar gibi aerobik stabilite açısından daha büyük riske sahip olan silolarda *L. buchneri* uygulaması daha net sonuçlar vermektedir (Web 2020).

- **Silaj yönetimi:** Silajın yapımı ve kullanımı sırasında aerobik stabilitesini azaltabilen faktörler arasında silolanacak ürünün önerilen nem ve doğrama uzunluğunda olmaması, yetersiz sıkıştırma/yoğunluk, silaj yapımı sırasında yüksek ortam sıcaklıkları, silonun yavaş doldurulması, iyi kapatılmaması veya paketlenmemesi (sızdırmazlık), silodan düşük silaj alımı (çıkarma oranı) ve dağıtım hızı ile zayıf yemlik yönetimi (yemlikte uzun kalış süresi) yer alır. İnokulasyon yapılmamış veya laktik asit üreten bakteri(ler) inokule edilmiş silajların silodan alımı sırasında ısınma geçmişine sahip olduğu durumlarda *L. buchneri*'nin aerobik stabiliteyi iyileştirmesi olasıdır (Combs ve Hoffman 2001; Bernardes ve ark. 2018; Borreani ve ark. 2018; Web 2020).

- **Silaj çeşidi:** Mısır silajı (özellikle yüksek kuru madde mısır silajları), diğer hasıl silajları ve yüksek

nemli tane mısır silajı, havaya maruz kaldıktan sonra baklagil veya çayır silajlarından daha fazla bozulmaya karşı hassastır. Hassas olan silajlara *L. buchneri* inokulasyonu yarar sağlayabilir. Eğer aerobik stabilite bir problemse, *L. buchneri* baklagil silajına da uygulanabilir (Combs ve Hoffman 2001; Zhou ve ark. 2016; Borreani ve ark. 2018). Hibrit tohumun çeşidi de mısır silajlarına uygulanan *L. buchneri* inokulasyonunun etkinliğini değiştirmektedir (Schmidt ve Kung 2010).

- **İklimsel koşullar:** Sıcak iklimlerde, tahıl silajlarının bozulma olasılığı daha da yüksektir, çünkü aerobik mayalar yüksek sıcaklıklarda daha aktiftir (Contreras-Govea ve Muck 2006; Kristensen ve ark. 2010; Zhou ve ark. 2016; Borreani ve ark. 2018). Büyüme mevsiminin sıcak ve iklimin nemli olduğu bölgelerde yetiştirilen mısırlardaki yüksek epifitik *Lactobacillus* bakteri sayısı inokulantların etkinliğini değiştirebilir (Queiroz ve ark. 2013). Mısır silajının silolanma sürecinde *L. buchneri* büyümesi için alt sınır çevre sıcaklığı 15°C'dir. Silolama sürecinde çevre sıcaklığı 25°C olduğunda fermantasyonun 60. gününde hakim *Lactobacillus* popülasyonu *L. buchneri* olmuştur (Zhou ve ark. 2016).

- **Bitkinin olgunluk dönemi:** *L. buchneri* içeren bir inokulantın farklı olgunluk aşamalarında hasat edilen mısır silajının fermantasyon ürünleri ve aerobik stabilitesi üzerindeki etki düzeyleri birbirinden farklı bulunmuştur (Comino ve ark. 2014).

- **Silolanacak ürünün bileşimi:** Mısırın özellikle kuru madde ve suda eriyebilir karbonhidrat (şeker) içeriği silolamadaki fermantasyon akışı ve mikrobiyal popülasyon üzerinde etkilidir (Bernardes ve ark. 2018). Orta derecede yüksek kuru madde içeriğine sahip silajların sıkıştırılması daha zor olduğundan çiftlik silolarının yönetilmesi daha zordur. *L. buchneri*'nin etkisi, orta derecede yüksek kuru madde içeriğine sahip mısır silajında daha belirgindir (Hu ve ark. 2009; Comino ve ark. 2014). Yüksek miktarda nişasta veya şeker içeren mısırdan yapılan silajlar, mikrobiyal aktivite için içerdiği bol miktardaki substrat nedeniyle bozulmaya daha duyarlı olacak ve olasılıkla daha fazla maya içerecektir (Contreras-Govea ve Muck 2006). Çok düşük pH'ya direnç gösteremeyen *L. buchneri* için silolanacak mısırın %33'ün altında kuru madde içermesi uygun değildir (Jones 2019).

(b) İnokulant olarak kullanımı sırasında dikkat edilmesi gereken etmenler

- **Spesifik suş:** *L. buchneri*'nin silajların aerobik stabilitesini geliştirmedeki etkinliği suşa göre değişiklik gösterir. Daha etkin suş (laktik asitten asetik asit

üretebilme veya FAE sentezleme etkinliği) veya kaba yem çeşidine özgün etkin suş konuları hâlâ araştırılmaktadır (Ranjit ve Kung 2000; Muck 2004; Kleinschmit ve ark. 2005; Contreras-Govea ve Muck 2006; Eikmeyer ve ark. 2015; Silva ve ark. 2018; Tanizawa ve ark. 2020; Web 2019, 2020).

- **Etkin doz:** Silajda aerobik stabilite süresi *L. buchneri*'nin uygulanan dozuna göre değişir ve 5×10^5 CFU/g veya daha fazla inokulasyonun mısır silajlarında en etkili olduğunu bildirilmiştir (Driehuis ve ark. 1999; Filya ve ark. 2006; Ranjit ve Kung 2000; Tabacco ve ark. 2011; Borreani ve ark. 2018). *L. buchneri* ile daha yüksek inokulasyon oranı, diğer silajlara göre mısır silajlarında daha tutarlı bir şekilde etkilidir. İnokulasyon yapılmayan mısır silajında aerobik stabilite 25 saat iken 5×10^5 CFU/g'dan az *L. buchneri* uygulananlarda 35 saat, 5×10^5 CFU/g'dan fazla *L. buchneri* uygulananlarda ise 503 saat olarak belirlenmiştir (Kleinschmit ve Kung 2006).

- **Silajın bekleme süresi:** Veriler *L. buchneri* tarafından laktik asidin asetik aside anaerobik dönüşümünün hızlı bir şekilde gerçekleşmediğini ve bunun belirginleşmesi için yaklaşık 30-60 gün geçmesi gerektiğini göstermektedir (Kristensen ve ark. 2010; Borreani ve ark. 2018; Muck ve ark. 2018; Silva ve ark. 2018). Queiroz ve ark. (2013) ise bu süreyi 120 gün olarak belirtmiştir.

- **İnokulantın sadece *L. buchneri* içermesi veya kombine olması:** *L. buchneri* ile birlikte birden fazla bakteri suşu içeren kombine inokulantlardaki bakterilerin silolama sürecinde farklı yararlı etkileri devam etmektedir (Driehuis ve ark. 2001; Hu ve ark. 2009; Schmidt ve Kung 2010; Borreani ve ark. 2018; Muck ve ark. 2018). Farklı bakteri türlerinin inokulantlara dahil edilme oranlarında göreceli farklılıklar ve belirli bir türün suşları arasındaki farklılıklar göz önüne alındığında, kombine inokulantlarla elde edilen sonuçlardaki değişiklikler şaşırtıcı olmamalıdır (Reich ve Kung 2010). Genel olarak kombine inokulantların başarısızlıkları, *L. buchneri* benzeri aktivite sergileyen doğal popülasyonun varlığı veya inokulanttaki *L. buchneri* suşunun herhangi bir nedenle fermantasyonun sonraki aşamalarına hakim olamaması nedeniyle ortaya çıkabilir (Muck ve ark. 2018).

- **Diğer etmenler:** İnokulantın formu (sıvı veya kuru), saklama koşulları, sulandırmada kullanılan suyun klor düzeyi, sulandırma sonrası kullanım için geçen süre, ürüne uygulanma şekli de *L. buchneri*'nin silajdaki etkinliği açısından dikkate alınması gereken etmenlerdir (Contreras-Govea ve Muck 2006).

Sonuç

L. buchneri, anaerobik koşullar altında yüksek miktarlarda asetik asit üreterek silajların aerobik stabilitesini arttırmak için kullanılan heterofermentatif bir laktik asit bakterisidir (Driehuis ve ark. 1999; Rabelo ve ark. 2017). Laktik asitten ek asetik asit oluşumunu sağlama *L. buchneri* için benzersizdir. Aerobik bozulma birincil endişe olduğunda, mısır silajı için hem geleneksel homofermentatif suşlar hem de heterofermentatif *L. buchneri* içeren kombine inokulant kullanımı, fermantasyonun ilk aşamalarında pH'nın hızlı düşüşünü ve sonraki depolama aşamalarında ise asetik asit üretimini sağlar (Holzer ve ark. 2003; Borreani ve ark. 2018). Böylece, diğerlerinden üstün aerobik stabilizeye sahip yüksek kaliteli (açılan siloda ve yemlikte daha uzun süre bozulmadan veya taze kalan) silajlar elde edilir.

Derlemede kısıtlar

Bu derlemede sadece *L. buchneri*'nin mısır silajı üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalar irdelenmiştir. *L. buchneri*'nin (a) başka silajlar, (b) kombine inokulantlardaki etki değişimi, (c) silajın besin madde bileşimi, (d) silajın tüketimi ve sindirilebilirliği, (e) rumende probiyotik etkisi olup olmadığı, (f) verim ve çevre kirliliği üzerindeki etkileri ve (g) benzer amaçla kullanılan diğer silaj katkı maddeleri ile karşılaştırılması ele alınmamıştır.

Kaynaklar

- Bernardes TF, Daniel JLP, Adesogan AT, McAllister TA, Drouin P, Nussio LG, Huhtanen P, Tremblay GF, Bélanger G, Cai Y. (2018) Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. *J. Dairy Sci.* 101(5): 4001–4019. doi: 10.3168/jds.2017-13703
- Borreani G, Tabacco E, Schmidt RJ, Holmes BJ, Muck RE. (2018) Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J. Dairy Sci.* 101(5): 3952–3979. doi: 10.3168/jds.2017-13837
- Combs DK, Hoffman PC. (2001) *Lactobacillus buchneri* for silage aerobic stability. *Focus on Forage*. Vol 3, No. 14. University of Wisconsin, Madison.
- Comino L, Tabacco E, Righi F, Revello-Chion A, Quarantelli A, Borreani G. (2014) Effects of an inoculant containing a *Lactobacillus buchneri* that produces ferulate-esterase on fermentation products, aerobic stability, and fibre digestibility of maize silage harvested at different stages of maturity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 198: 94–106. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2014.10.001
- Contreras-Govea F, Muck R. (2006) Microbial inoculants for silage. *Focus on Forage*. Vol 8, No. 4. University of Wisconsin, Madison.
- Danner H, Holzer M, Mayrhuber E, Braun R. (2003) Effect of acetic acid on the aerobic stability of silages. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1): 562–567. doi: 10.1128/aem.69.1.562-567.2003

- Driehuis F, Oude Elferink SJWH. (2000). The impact of the quality of silage on animal health and food safety: A review. *Vet. Quart.* 22(4): 212-217. doi: 10.1080/01652176.2000.9695061
- Driehuis F, Oude Elferink SJWH, Spoelstra SF. (1999) Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J. Appl. Microbiol.* 87(4): 583–594. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00856.x.
- Driehuis F, Oude Elferink SJWH, Van Wikselaar PG. (2001) Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass Forage Sci.* 56(4): 330–343. doi: 10.1046/j.1365-2494.2001.00282.x
- Drouin P, Tremblay J, Chaucheyras-Durand F. (2019) Dynamic succession of microbiota during ensiling of whole plant corn following inoculation with *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus hilgardii* alone or in combination. *Microorganisms.* 7(12): 595-616. doi: 10.3390/microorganisms7120595
- Eikmeyer FG, Heintz S, Marx H, Pühler A, Grabherr R, Schlüter A. (2015) Identification of oxygen-responsive transcripts in the silage inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 by RNA sequencing. *Plos One.* 10(7): e0134149. doi:10.1371/journal.pone.0134149
- Filya İ. (2003) The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. *J. Appl. Microbiol.* 95(5): 1080–1086. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02081.x
- Filya İ, Sucu E, Karabulut A. (2006) The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. *J. Appl. Microbiol.* 101(6): 1216–1223. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03038.x
- Holzer M, Mayrhuber E, Danner H, Braun R. (2003) The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol.* 21(6): 282-287. doi: 10.1016/S0167-7799(03)00106-9
- Hu W, Schmidt RJ, McDonnell EE, Klingerman CM, Kung Jr. L. (2009) The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. *J. Dairy Sci.* 92(8): 3907–3914. doi: 10.3168/jds.2008-1788
- Jones LR. (2019) *L. buchneri*: The rest of the story. American Farm Products, Inc. Erişim adresi: http://afpltd.net/wp-content/uploads/2018/02/L.BUCHNERI_rest-of-the-story-V4.pdf Erişim tarihi: 10.9.2020
- Kang TW, Adesogan AT, Kim SC, Lee SS. (2009) Effects of an esterase-producing inoculant on fermentation, aerobic stability, and neutral detergent fiber digestibility of corn silage. *J. Dairy Sci.* 92(2): 732–738. doi:10.3168/jds.2007-0780
- Kleinschmit DH, Kung Jr.L. (2006) A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages *J. Dairy Sci.* 89(10): 4005–4013. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72444-4
- Kleinschmit DH, Schmidt RJ, Kung Jr. L. (2005) The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci.* 88(6): 2130–2139. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72889-7
- Kristensen NB, Sloth KH, Højberg O, Spliid NH, Jensen C, Thøgersen R. (2010). Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. *J. Dairy Sci.* 93(8): 3764–3774. doi: 10.3168/jds.2010-3136
- Mari LJ, Schmidt RJ, Nussio LG, Hallada CM, Kung Jr. L. (2009) Short communication: An evaluation of the effectiveness of *Lactobacillus buchneri* 40788 to alter fermentation and improve the aerobic stability of corn silage in farm silos. *J. Dairy Sci.* 92(3):1174–1176. doi: 10.3168/jds.2008-1700
- Moon NJ. (1983) Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J. Appl. Microbiol.* 55(3): 453–460. doi: 10.1111/j.1365-2672.1983.tb01685.x
- Muck RE. (1996) A lactic acid bacteria strain to improve aerobic stability of silages. Pages 42–43 in 1996 U.S. Dairy Forage Research Center 1996 Research Summaries. U.S. Dairy Forage Res. Ctr., Madison, WI.
- Muck RE. (2004) Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. *Trans. ASAE* 47(4): 1011–1016. doi: 10.13031/2013.9144
- Muck RE, Nadeau EMG, McAllister TA, Contreras-Govea FE, Santos MC, Kung Jr L. (2018) Silage review: Recent advances and future uses of silage additives *J. Dairy Sci.* 101(5): 3980–4000. doi: 10.3168/jds.2017-13839
- Nishino N, Yoshida M, Shiota H, Sakaguchi E. (2003) Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *J. Appl. Microbiol.* 94(5): 800–807. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01810.x.
- Nishino N, Wada H, Yoshida M, Shiota H. (2004) Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *J. Dairy Sci.* 87(8): 2563–2570. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73381-0.
- Nsereko VL, Smiley BK, Rutherford WM, Spielbauer A, Forrester KJ, Hettinger GH, Harman EK, Harman BR. (2008) Influence of inoculating forage with lactic acid bacterial strains that produce ferulate esterase on ensilage and ruminal degradation of fiber. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145(1-4): 122–135. doi: 10.1016/j.anifeeds.2007.06.039
- Oude-Elferink SJWH, Krooneman J, Gottschal JC, Spoelstra SF, Faber F, Driehuis F. (2001) Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(1): 125–132. doi: 10.1128/AEM.67.1.125–132.2001
- Queiroz OCM, Arriola KG, Daniel JLP, Adesogan AT. (2013) Effects of 8 chemical and bacterial additives on the quality of corn silage. *J. Dairy Sci.* 96(9): 5836–5843. Doi: 10.3168/jds.2013-6691
- Queiroz OCM, Ogunade IM, Weinberg Z, Adesogan AT. (2018) Silage review: Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives. *J. Dairy Sci.* 101(5): 4132–4142. doi: 10.3168/jds.2017-13901
- Rabelo CHS, Basso FC, Lara EC, Jorge LGO, Härter CJ, Mari LJ, Reis RA. (2017) Effects of *Lactobacillus buchneri* as a silage inoculant or probiotic on in vitro organic matter digestibility, gas production and volatile fatty acids of low dry-matter whole-crop maize silage. *Grass Forage Sci.* 72(3): 534-544. doi: 10.1111/gfs.12273
- Raffrenato E, Fievisohn R, Cotanch KW, Grant RJ, Chase LE, Van Amburgh ME. (2017) Effect of lignin linkages with other plant cell wall components on in vitro and in vivo neutral detergent fiber digestibility and rate of digestion of grass forages. *J. Dairy Sci.* 100(10): 8119–8131. doi: 10.3168/jds.2016-12364
- Ranjit NK, Kung Jr L. (2000) The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci.* 83(3): 526–535. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74912-5
- Reich LJ, Kung Jr. L (2010) Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermenta-

- tation and aerobic stability of corn silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159(3): 105–109. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2010.06.002
- Schmidt RJ, Kung Jr. L. (2010) The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. *J. Dairy Sci.* 93(4): 1616–1624. doi: 10.3168/jds.2009-2555
- Silva LD, Pereira OG, Silva TC, Leandro ES, Paula RA, Santos SA, Ribeiro KG, Valadares Filho SC. (2018) Effects of *Lactobacillus buchneri* isolated from tropical maize silage on fermentation and aerobic stability of maize and sugarcane silages. 73(3): 660–670. doi: 10.1111/gfs.12360
- Tanizawa Y, Kobayashi H, Nomura M, Sakamoto M, Arita M, Nakamura Y, Ohkuma M, Tohno M. (2020) *Lactobacillus buchneri* subsp. *silagei* subsp. nov., isolated from rice grain silage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70(5): 3111–3116. doi: 10.1099/ijsem.0.004138
- Tabacco E, Piano S, Cavallarin L, Bernardes TF, Borreani G. (2009) Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. *J. Appl. Microbiol.* 107(5): 1632–1641. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04344.x
- Tabacco E, Piano S, Revello-Chion A, Borreani G. (2011) Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. *J. Dairy Sci.* 94(11): 5589–5598. doi: 10.3168/jds.2011-4286
- Yıldırım Z, Avşar YK, Yıldırım M. (2002) Factors affecting the adsorption of buchnericin LB, a bacteriocin produced by *Lactobacillus buchneri*. *Microbiol. Res.* 157(2): 103–107. doi: 10.1078/0944-5013-00134
- Yıldırım Z, Yıldırım M. (2001) Characterization of buchnericin LB produced by *Lactobacillus buchneri* LB. *Turk. J. Biol.* 25(1): 73–82.
- Web (2019) *Lactobacillus buchneri* DSM 29026. European Commission EURL Evaluation Report. Erişim adresi: https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/finrep_fad-2018-0093_lactobacillus-buchneri-dsm29026.pdf Erişim tarihi: 10.9.2020
- Web (2020) Buchneri inoculants to improve corn silage bunk life. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Ontario. Erişim adresi: http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/info_buchneri.htm Erişim tarihi: 10.9.2020
- Woolford MK. (1990) The detrimental effects of air on silage. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 101–116. doi: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb02554.x
- Vos PD, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB. eds. (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3, 2nd ed. Springer, New York. doi: 10.1007/b92997
- Zielińska K, Fabiszewska A, Świątek M, Szymanowska-Powalowska D. (2017) Evaluation of the ability to metabolize 1,2-propanediol by heterofermentative bacteria of the genus *Lactobacillus*. *Electron. J. Biotechnol.* 26: 60–63. doi: 10.1016/j.ejbt.2017.01.002
- Zhou Y, Drouin P, Lafrenière C. (2016) Effect of temperature (5–25°C) on epiphytic lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage. *J. Appl. Microbiol.* 121(3): 657–671. doi: 10.1111/jam.13198



Veteriner sahada güncel mikrobiyota kavramı

Emre Küllük^{1*}, Duygu Dalğın²

^{1,2} Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 13.01.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 05.04.2021

Özet: Mikrobiyota; canlı vücudunda başlıca, gastrointestinal, deri, solunum, ürogenital sistemin hayati organlarında bulunan, bakteri, virus, mantar ve arkeleri ifade eder. Mikrobiyotanın genomu, canlı genomundan 1000 kat daha fazla gen dizilimi içerir. Mikrobiyotanın vücutta enerji metabolizması, hepatik fonksiyonlar, immün sistem gelişimi, motor sistem ve endokrin fonksiyonları üzerine etkileri vardır. Mikrobiyota kompozisyonu; diyet, antibiyotik kullanımı, stres gibi faktörlerden dolayı bozulabilmektedir ve mikrobiyotanın dengesinin bozulmasına "disbiyozis" denir. 2007 yılında daha sonraki araştırmalara ışık tutacak olan İnsan Mikrobiyom Projesi faaliyete geçirilmiş ve insan mikrobiyotasının özelliklerinin belirlenmesinde büyük önem taşımıştır. Çiftlik ve pet hayvanlarında yapılan çalışmalar henüz yenidir. Çiftlik hayvanlarında verim özelliklerinin artmasında, yemden yararlanmanın maksimum düzeyde tutulabilmesinde, süt yağının artmasında mikrobiyotanın çok önemli bir rolü vardır. Pet hayvanlar, özellikle de köpekler ilk çağlardan beri insanoğluna eşlik edip, insanlarla hem yaşam alanını hem de mikrobiyotasını paylaşmaktadır. Evcil hayvan varlığının hem yetişkinler için, hem de özellikle yeni doğan çocukların mikrobiyota gelişiminde büyük bir rolü olduğu ve astım, alerjik rinit, atopik dermatit gibi alerjik hastalıkların görülme oranını azalttığı kanıtlanmıştır. Veteriner sahada mikrobiyota çalışmaları dünyada henüz son yıllarda çalışılmaya başlanmış olup, gün geçtikçe daha fazla araştırma yapılmaktadır ve hala araştırılmayı bekleyen birçok konu bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Çiftlik hayvanları, kanatlı, mikrobiyota, pet, probiyotik

Current microbiota concept in veterinary medicine

Abstract: Microbiota refers to bacteria, viruses, fungi and archaea which are found in vital systems such as the gastrointestinal system, skin, respiratory system and urogenital system. The genome of the microbiota contains 1000 times more gene sequences than the organism genome. Microbiota has effects on energy metabolism, hepatic functions, immune system development, motor system and endocrine functions. Microbiota composition can break down by diet, use of antibiotics, stress, etc., and the disruption of this balance on microbiota is called "dysbiosis". In 2007, the Human Microbiology Project activity, which will shed light on further research, has been carried out and has great importance in determining the character of human microbiota. The studies on microbiota of farm animal and pets are unprecedented yet. Microbiota has a crucial role in increasing the milk yield in order to increase the yield characteristics of farm animals and to maximize the utilization of feed. Pets, especially dogs, have been accompanied by humans since the early ages and share both the habitat and the microbiota with humans. It has been proven that the presence of the pet has a major role in the development of microbiota, both for adults and especially for newborn children, and reduces the incidence of allergic diseases such as asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis. Microbiota studies in veterinary medicine are relatively new and there is still many issues to be investigated.

Keywords: Livestock, microbiota, pet, poultry, probiotic

Giriş

Mikrobiyota; organizmada yaşayan mikroorganizmalar sistemini, milyarlarca mantar, bakteri ve tek hücrelilerden oluşan, hayati öneme sahip, çok hassas bir süper organı anlatmakta olup, canlılarla birlikte yaşayan özel türlerin tamamını ifade etmektedir. Mikrobiyota, konakçı vücudundan 10 kat daha fazla hücreye ve 10^{12} kat daha fazla gene sahiptir (Suchodolski 2011).

Mikrobiyom ise mikroorganizmaların toplam sayısını ve bunların genetik materyalini ifade eder

ve mikrobiyota teriminden farklıdır. Mikrobiyom konak için birçok olumlu etki sağlar: geçici bakterilere karşı savunmacı bir bariyer görevi görür; besin yıkımına ve diyetten enerji kazanımına yardımcı olur; enterositler için besin metabolitleri sağlar ve konakçı bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Ackerman 2007). Sağlıklı ve stabil bir mikrobiyom aynı anda pro ve anti inflamatuvar etki yaparken, enfeksiyonlara verilen yanıtta aşırı yangıyı önleyerek bir denge sağlamaktadır (Pilla ve Suchodolski 2020).

*İlk yazarın 2017 tarihli doktora seminerinden özetlenmiştir.

Yazışma adresi / Correspondence: DilekEmre Küllük, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye E-posta: emre.kulluk@omu.edu.tr

ORCID IDs of the authors: ¹0000-0001-9128-355X • ²0000-0001-5253-5232

Bağırsak mikrobiyomunun bileşimindeki olumsuz değişimlere disbiyozis denir. İnsanlarda disbiyozisin ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi yangısal bağırsak hastalıklarına yatkınlık sağladığı ortaya konulmuştur (Tomasello ve ark. 2016). Hayvanlardaki akut veya kronik bağırsak yangıları gibi gastrointestinal sistem disfonksiyonlarının en belirgin nedeni bağırsak disbiyozisidir. Disbiyozis’de mikrobiyotanın yanı sıra kısa zincirli yağ asitleri ve triptofan gibi bakteriyel metabolitlerde de fonksiyon bozuklukları görülmektedir (Pilla ve Suchodolski 2020). Yakın zamanda geliştirilen ve “Disbiyoz İndeksi” olarak adlandırılan PCR tabanlı bir algoritma, veteriner hekimlerin bağırsak disbiyozunu ölçmelerine olanak tanıyan bir araçtır ve hastalığın ilerlemesini ve tedaviye yanıtı izlemek için kullanılabilir (Al-Shawaqfeh ve ark. 2017). Yapılan son çalışmalar hayvanlarda ve insanlarda obezite Kieler ve ark.(2017), metabolik hastalıklar Montoya-Alonsu ve ark.(2017), kanser Zitwogel ve ark.(2017), nörolojik sistem bozuklukları Wu ve ark.(2016) ve diğer hastalıklar ile disbiyozisin ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

Bağırsak mikrobiyotası, enterik sinir sisteminin gelişimi için gereklidir. Bir nörotransmitter olan ve bağırsak-beyin eksenini teriminin ortaya çıkmasını sağlayan serotoninin yüzde 90’ı bağırsak duvarından salgılanmaktadır ve burada enterik sinir sisteminden motilite, sekresyon ve kan akışını düzenlemektedir (De Vadder ve ark. 2018). Serotonin üretimi ayrıca kısmen mikrobiyom tarafından, serotoninin bakteriler tarafından doğrudan üretimi veya serotonin öncüsü olan triptofan amino asidinin tüketimi ile kontrol edilmektedir (O’ Mahony ve ark. 2015). Ayrıca bağırsak ve bağırsak bakterileri bazı nörokimyasallar üretirken beynin ruh, hafıza ve öğrenme durumunu etkiler. Buna bağlı olarak, disbiyozisin stres, kaygı, anksiyete, depresyon gibi durumları tetikleyebildiği ve şizofreni gibi mental bozuklukların altyapısını oluşturma kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (Dickerson ve ark. 2017; Pilla ve Suchodolski 2020).

Bağırsak mikrobiyotasının bileşimi ayrıca bağışıklık fonksiyonu üzerinde önemli etkilere sahiptir ve yerel antikor üretimini düzenler (Tizard ve Jones 2018). Bağırsakta yardımcı T (T helper) hücre prekürsörleri, mikrobiyotadan alınan sinyale bağlı olarak Treg veya Th17 hücrelerine farklılaşabilmektedir. Homeostazda Treg hücrelerinin üretimi tercih edilir, Treg hücreleri Th17 hücrelerinin üretimi baskılar ve bağırsak duvarında yangının minimal düzeyde meydana gelmesini sağlar. Treg hücrelerinin yokluğunda ise, efektör T hücreleri kontrolsüz olarak mikrobiyal antijenlere yanıt vererek yangıyı tetiklemektedir (Tizard ve Jones 2018). Bazı spesifik bakteri grupları bu

süreci etkileyebilir: Örneğin, *Clostridium IV ve XIVa* grubu üyelerinin Treg indüksiyonunu uyardığı, anti yangısal yanıtı indüklediği, segmentli filamentöz bakterilerin ise yangı öncüsü sinyaller üreten Th17 hücrelerini indüklediği görülmüştür (Ivanov ve ark. 2009; Atarashi ve ark. 2011).

Sırtlan popülasyonlarında, aynı aile grubundaki üyelerinin anal bezlerinde diğer aile üyelerine kıyasla daha fazla benzer mikrobiyal topluluk barındırdığı ve anal bezlerindeki bu mikrobiyal topluluklardan gelen koku sekresyonlarının, aile üyelerinin, grubundaki diğer üyelerini tanımasına olanak sağlayan faktörler olduğu ortaya konmuştur (Theis ve ark. 2012). Patlayıcı tespit köpeklerinde metronidazolun oral yoldan verilmesinin, köpeklerin tespit yeteneğini değiştirdiğini bildirilmiştir. (Jenkins ve ark. 2016).

Yapılan çalışmalar, farelerde diyet değiştirerek veya antimikrobiallerin uygulanmasıyla bağırsak mikrobiyotasının manipüle edilmesinin beyindeki zihinsel durumda, davranış ve gen ekspresyon düzeylerinde değişikliklere neden olabileceğini göstermektedir ve germ-free farelerde yapılan çalışmalar, mikrobiyotanın olfaktörük epitelin fizyolojisini de değiştirebildiğini ve normal bağırsak mikrobiyotası ile kolonize olan germ-free farelerde kolonizasyondan sonra motor aktivitesinde artış ve anksiyete tepkilerinde azalma görülmüştür. (Diaz ve ark. 2011; Dickerson ve ark. 2017). Ayrıca germ free farelerde normal farelere göre ince bağırsak yüzey alanlarının azaldığı, bağırsak vilus ve kriplerinin kısaldığı, lamina propria katmanının incelendiği, geçiş zamanının uzadığı, yağ asidi konsantrasyonunun ve bağırsak ozmolaritesinin azaldığı ortaya konulmuştur (Al-Asmakh ve Zadjali 2015). Bu bulgular mikrobiyotanın konağın fizyolojisini ve davranışını etkileyebileceğini göstermektedir.

Çiftlik Hayvanlarında Mikrobiyota

Geviş getiren hayvanlar rumenlerinde, çoğunlukla bakteri, arkea, siliyer protozoa, mantar ve virüslerden oluşan çok çeşitli simbiyotik bir mikrobiyota bulundurmaya üzere evrimleşmişlerdir (Firkins ve Yu 2015). Sığırlar rumen ve bağırsaklarında bitkilerden sağlanan liflerin parçalanmasını sağlayan, protein yapısında olmayan azotu proteine çeviren, çeşitli vitaminleri sentezleyen ve sindirim sistemindeki zararlı bileşikleri temizlemeye yardımcı olan ve bu sayede yemden yararlanmayı ve verimi artıran çok güçlü ve kompleks bir mikrobiyotaya sahiptirler. Bu sindirim sistemi mikrobiyotası hayati bir öneme sahiptir ve rumen ve bağırsak mikrobiyotasının disbiyozisi; sağlık durumu, metan salınımı, süt ve et gibi verim

özellikleri ve hayvan refahını doğrudan etkilemektedir (Li ve Guan 2017; Difford ve ark. 2018). Sindirim sistemi yollarında bulunan bakteri türlerinin sayısının 5,000'den fazla olduğu tahmin edilmekle birlikte, diyet, beslenme stratejisi ve coğrafi konuma bağlı olarak değişmektedir. Sığırlarda ön mide ve bağırsaklar; içeriğin fermantasyonunu sağlayan bakteriler, arkealar, mantarlar, protozoonlar ve virüslerden oluşan çeşitlilik gösteren kalabalık bir mikrobiyotayı barındırmaktadır ve bakteriyel konsantrasyonları, içeriğin mililitre'sinde(ml) 10^{12} - 10^{14} hücreye ulaşmaktadır (Russel ve Rychlik 2001; Krause ve ark. 2013; Henderson ve ark. 2015).

Sığırlardaki rumen ve bağırsak mikrobiyotasının disbiyozunun; subakut ve akut rumen asidozu, süt yağında azalma, timpani gibi birçok metabolik hastalığın yanı sıra, vajinal kanal ve meme dokusu gibi vücuttaki diğer bölgelerin mikrobiyotalarını da etkileyerek mastitis gibi hastalıkların da ortaya çıkmasına veya şiddetlenmesine sebep olabilmektedir (Khafipour ve ark. 2009; Azad ve ark. 2015; Derakhshani ve ark. 2016; Plaizer ve ark. 2017).

Yapılan çalışmalarda rumen mikrobiyotasının tür ve ırk bazında farklılık gösterebileceği ortaya konulmuştur. Örneğin, aynı diyetle beslenen Holstein ve Jersey ırkı süt sığırları arasında rumen mikrobiyotasının bileşiminde farklılıklar tespit edilmiştir (Paz ve ark. 2016). Ayrıca, bu çalışmada laktasyon döngüleri ve yaş gibi birçok faktör karşılaştırılmıştır ve bu faktörlerin rumen mikrobiyotasındaki farklılaşmaya katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Jami ve ark. 2013; Jewell ve ark. 2015).

Tablo 1. Sığır sindirim sisteminin mikrobiyal karakteri

Rumen	Kalın Bağırsaklar
<i>Bacteroidetes</i>	Buzağılarda;
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Fibrobacter</i>	<i>Firmicutes</i>
Arkeler	<i>Atopobium</i>
Protozoa türleri	<i>Bifidobacteria</i>
	Sığırlarda;
	<i>Bacteroidetes</i>
	<i>Firmicutes</i>
	<i>Fibrobacter</i>

Son yıllarda, süt ineklerinin süt üretim potansiyeli tüm dünyada önemli ölçüde artmıştır ve buna bağlı olarak süt ineklerinin ihtiyaçlarının karşılanması ve süt verimlerinin artırılması için rasyonlarında değişiklikler yapılarak yüksek enerjili diyetlere geçilmiştir. Bu diyetler, mikrobiyotanın kompozisyonunu ve işlevselliğini değiştirerek ve fırsatçı patojenlerin kolonizasyonuna yol açarak sindirim sistemini mik-

robiyotasını olumsuz etkileyebilmektedirler (Russel ve Rychlik 2001; Plaizer ve ark. 2008; Krause ve ark. 2013).

Kanatlı Mikrobiyotası

Bütün omurgalılar gibi, kanatlılar da bağırsaklarında çeşitli konakçılara beslenme ve patojenlerden koruma sağlamada önemli görevlere sahip çeşitli mikroorganizma topluluklarını barındırır. Kanatlı mikrobiyotası alanında, araştırmalar daha çok tavuk gibi yetiştirme önemi olan kanatlı türleri üzerinde yoğunlaşmıştır. (Waite ve Taylor 2015). Tavukların gastrointestinal sistemi, bakterilerin yoğunlukta olduğu karmaşık mikrobiyal topluluklarla (bakteriler, mantarlar, arkeler, protozoalar ve virüsler) yoğun bir şekilde kuşatılmıştır (Wei ve ark. 2013). Tavuk gastrointestinal sistemi, diyet ve sağlık arasındaki bağlantıyı sağlayan karmaşık ve biyoçeşitlilik açısından zengin bir mikrobiyal topluluğa ev sahipliği yapmaktadır. Tavuklarda sindirim sistemi mikrobiyotası yaklaşık olarak 500 filotipe ve 1 milyon bakteriyel gene ev sahipliği yapar ve bu da tavuk genomundaki sayının yaklaşık 40-50 katına eşittir (Maki ve ark. 2019). Bu bakteriler vitaminler (K vitamini ve B vitamini grupları), kısa zincirli yağ asitleri (asetik asit, bütirik asit ve propiyonik asit), organik asitler (laktik asit) ve antimikrobiyal bileşikler (bakteriyosinler) üretmekte ve hayvan için beslenme ve korunma sağlayan non-patojenik bağışıklık yanıtını uyarmaktadır (Jeurissen ve ark. 2002; Apajalahti 2005; Dibner ve Richards 2005; Yegani ve Korver 2008). Son yıllarda yapılan çalışmalar ise bağırsak mikrobiyotasının genç broilerlerin immünolojik fonksiyonlarını modüle edebileceğini ve ayrıca mikrobiyotanın metabolik ve immün fonksiyonu geliştirmenin yanı sıra yangısal yanıtı toleransı artırdığını da göstermektedir (Rodrigues ve ark. 2020).

Kanatlı gastrointestinal sistemi kursak, proventrikül, taşlık, duodenum, jejunum, ileum, sekum, kalın bağırsak ve kloakadan oluşur (Yeoman ve ark. 2012).

Kursak yaklaşık olarak 10^8 - 10^9 koloni oluşturan birim/ gram (kob/gr) bakteriye ev sahipliği yapmaktadır ve kursaktaki baskın tür *Lactobacillus* türleridir (Gong ve ark. 2007). Taşıktaki mikrobiyotaya kursaktaki benzer fakat pH daha düşük olduğundan dolayı bakteriyel aktivite daha düşüktür. Taşıktaki bakterileri türleri *Lactobacilli*, *Enterococci*, *Enterobacteria* türleridir (Rehman ve ark. 2007). İnce bağırsak segmentleri arasında en düşük bakteriyel yoğunluk kısa geçiş süresi ve salgılanan safra sıvısından kaynaklı olarak duodenumda bulunur ve genellikle Clostridia, Streptococci, Enterobacteria ve Lactobacilli türlerinden oluşmaktadır (Waite ve Taylor 2015).

İleum'da baskın tür *Lactobacillus* olmakla birlikte bunu *Clostridiaceae*, *Streptococcus* *Enterococcus* aileleri izlemektedir. Sekumda ise baskın olarak *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumları tespit edilmiştir (Kumar ve ark. 2018).

Su Canlılarında Mikrobiyota

Genetik, beslenme ve çevresel faktörlerden etkilenebilen deniz ve tatlı su türlerinin endojen mikrobiyotasında bulunan taksonlarda çok çeşitli varyasyonlar bulunmaktadır. *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Carnobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Photobacterium*, *Pseudomonas* ve *Vibrio* türleri çeşitli deniz türlerinin baskın mikrobiyotalarını oluştururken (Balcázar ve ark 2010; Dhanasiri ve ark. 2011; Askarian ve ark. 2012); tatlı su türlerinde ise *Enterobacteriaceae* ailesinden *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Lactococcus* ve *Pseudomonas*, ve ayrıca zorunlu anaerobik bakteri türlerinden *Bacteroides*, *Clostridium* ve *Fusobacterium* baskın olarak bulunmaktadır (Li ve ark. 2012; Wu ve ark. 2012).

Pet Mikrobiyota Çalışmaları

Kedi ve köpeklerde üzerinde en çok çalışılan başlıca mikrobiyota alanları; gastrointestinal sistem, solunum sistemi ve deri sistemi mikrobiyotasıdır (Suchodolski 2011).

İnsanlar ve çiftlik hayvanlarıyla karşılaştırıldığında, kedi ve köpekler nispeten daha basit bir gastrointestinal sisteme sahiptirler. Gastrointestinal sistem, insan ve diğer hayvan türlerinde başlıca mikrobiyota yaşam alanıdır. Memeli sindirim sistemi mikrobiyotası çeşitli ve karmaşık, birbirlerine bağımlı ve rekabet etmeyen çok sayıda türden oluşmuştur (Eckburg ve ark. 2005; Ley ve ark. 2008).

Mikrobiyota kompozisyonu gastrointestinal sistem boyunca farklılıklar gösterir. Distal bölümlerde anaerobik bakteri grupları ağırlıkta iken, proksimal bölümlerinde ise aerobik ve anaerobik bakterilerin daha eşit dağıldığı gözlemlenmiştir (Simpson ve ark. 2002; Suchodolski ve ark. 2008).

Sindirim sistemi mikrobiyotası birçok mekanizma aracılığıyla konakçıya fayda sağlar. Kommensal bakteriler geçici patojenlere karşı savunma bariyeri oluşturur. Besin sindirimine yardımcı olurlar, konakçı için önemli metabolitleri sağlarlar ve ayrıca konakçının bağışıklık sistemini modüle etmede önemli bir işlevleri vardır (Suchodolski 2011).

Midedeki ana bakteri türleri *Helicobacter* ve *Lactobacillus spp.*dir. Köpeklerin mide biyopsisinden bakteriyel kültür teknikleri kullanılarak yapılan bir

çalışmada midedeki bakteri sayısı 10^6 kob/g olarak bulunmuş ve bulunan dizinlerin en fazla *Proteobacteria* filumuna (%99,6) ait olduğu saptanmıştır. Ayrıca *Firmicutes* filumuna ait az sayıda (%0,3) dizin bulunmuştur. *Proteobacteria* filumundan ise en çok *Helicobacter spp.* türlerine rastlanmıştır (%98,6) (Benno ve Nakao 1992; Garcia-Mazcorro ve ark. 2012).

Tablo 2. Kedi ve Köpeklerde Lokalizyona Göre Baskın Bakteri Grupları

	KÖPEK	KEDİ
MİDE	Helicobacter Lactobacillus spp. Proteobacteria	Helicobacter Lactobacillus spp Proteobacteria
DUEDENUM	Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes, Fusobacteria Actinobacteria	Bacterioides Firmicutes Fusobacteria
JEJENUM	Proteobacteria Firmicutes Actinobacteria Spirochaetes Bacteroidetes Fusobacteria	Enterococcus Streptococcus spp Lactobacillus spp.
İLEUM	Proteobacteria Firmicutes Actinobacteria Spirochaetes Bacteroidetes Fusobacteria	Clostridium Bacterioides spp.
KOLON	Fusobacteria Bacterioides Firmicutes	Streptococcus spp Lactobacillus spp. Erysipelotrix spp. Clostridium Bacterioidetes Proteobacteria Actinobacteri

Duodenal mikrobiyota 6 filum içermektedir. Bunlar; *Firmicutes* (%46,4), *Proteobacteria* (%26,6), *Bacteroidetes* (%11,2), *Spirochaetes* (%10,3), *Fusobacteria* (%3,6) ve *Actinobacteria* (%1) (Xenoulis 2008).

Jejenumda ise 10 farklı bakteri filumu tespit edilmiştir. Başlıca bakteri filumları *Proteobacteria* (%46,7), *Firmicutes* (%15,0), *Actinobacteria* (%11,2), *Spirochaetes* (%14,2), *Bacteroidetes* (%6,2) ve *Fusobacteria*'dır (%5,4). En yaygın bakteri türleri ise *Gamma-proteobacteria* (~%40), *Spirochaetes* (~%13), *Actinobacteria* (~%12), *Clostridia* (~%10), *Bacteroidetes* (~%6), *Fusobacteria* (~%4), ve *Alpha-proteobacteria* (~%3) dir (Suchodolski ve ark. 2009).

Kalın bağırsaklar en fazla bakteri yoğunluğuna ve çeşitliliğine sahip olan bölgedir (10^9 - 10^{11} kob/g). Sağlıklı köpeklerde kolon mikrobiyotasında baskın

olarak *Fusobacteria*, *Bacteroides* ve *Firmicutes* (Her biri %30 oranında) içermektedir (Suchodolski ve ark. 2008).

Sindirim sistemi mikrobiyotası sadece bakterilerle değil, aynı zamanda mantarları, arkeleri ve virüsleri de içerir. Bağırsak bölgesinden PCR (Polimer Zincir Reaksiyonu) analizi yapılan bir çalışmada sağlıklı köpeklerin %61'inde, kronik enteropatili köpeklerin ise %79'unda mantar DNA'sı tespit edilmiştir ve en çok identifiye edilen mantar sınıfı *Saccharomycetes*'tir (Suchodolski ve ark. 2008).

Kedi ve köpeklerde bildirilmiş viral filotipler *Rotavirus*, *Coronavirus*, *Parvovirus*, *Norovirus*, *Astrovirus*, *Distemper virus*, ve *Paramyxoviruslar*'dır (Mochizuki ve ark. 2001; Kempf ve ark. 2010).

Solunum sistemi mikrobiyotasına ilişkin araştırmaların çoğu insanlarda yapılmıştır ve insanlarla birlikte çevreyi paylaşan evcil hayvanlardaki hava yolu mikrobiyotasının bileşimi hakkında bilgiler daha sınırlıdır. Yangısal hava yolu hastalıkları, köpeklerde ve kedilerde kronik bronşitte ve kedilerde alerjik astımda yaygındır. İnsanlarda, sağlıklı ve astımlı solunum yolları arasındaki mikrobiyal bileşimdeki farklılıklar bildirilmiştir (Hilty ve ark. 2010; Marri ve ark. 2013; Huang ve ark. 2015). Son zamanlardaki çalışmalarda köpeklerde solunum yolu mikrobiyotasında *Protobacteria*, *Tenericutes* ve *Actinobacteria*'lar identifiye edilmiştir ve sağlıklı köpeklerde ortaya konan bu veriler, enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan yangısal solunum hastalıklarında mikrobiyal toplulukların rolünün anlaşılması açısından önemlidir (Ericsson ve ark. 2016). Kedilerde ise sağlıklı solunum yolu mikrobiyota kompozisyonunu belgeleyen bir çalışma ise henüz yayınlanmamıştır (Vientós-Plotts ve ark. 2017).

Köpeklerde yapılan mikrobiyota çalışmalarında atopik dermatitisli hayvanların mikrobiyotasındaki bakteriyel ve fungal toplulukların sağlıklı hayvanlara göre daha az çeşitlilik gösterdiği saptanmıştır. İnsanlarla benzer şekilde, her köpektaki farklı deri bölgeleri çeşitli ve kendine özgü mikrobiyotayla kuşatılmış ve farklı köpekler ve farklı bölgelerde ciddi kişisel farklılıklar belirlenmiş ve ayrıca mukozal yüzeylere nazaran (dudaklar, burun, kulak ve konjonktiva) kıllı bölgelerde daha yüksek mikrobiyal bir çeşitlilik tespit edilmiştir. Burun deliği ve konjuktiva en düşük mikrobiyal yoğunluğu içerirken, aksillar bölge ve burnun dorsal kısmı en yüksek mikrobiyal çeşitliliği göstermiştir. Ortalama olarak, köpek burnu dorsalinde yaklaşık 300 farklı bakteri cinsi tespit edilmiştir. Bütün bu yüzeylerdeki baskın filumlar, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* ve *Bacteroidetes*'dir (Rodrigues-Hoffmann ve ark. 2014). Kedilerde ise

deri mikrobiyotasına *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Streptococci* ve *Staphylococci*'nin egemen olduğu bulunmuştur (Krogh ve Kristensen 1976).

Hayvan ve İnsan Mikrobiyota Etkileşimi

Evcil hayvanların insan sağlığına yarar sağladığı fikri, ilk olarak 1989'da alerjik hastalık riskini aşırı hijyenik ortamlara bağlayan David Strachan tarafından ortaya atılmıştır (Strachan 1989). Bebeklik evresinde bağırsak mikrobiyal disbiyozun alerjik hastalığın gelişimi ile ilişkili olduğuna dair daha fazla kanıt ile bu görüş mikrobiyota hipotezi olarak revize edilmiştir (Wold 1998; Hesselmar ve ark. 1999; Litonjua ve ark. 2002; Ownby ve ark. 2002; Lodge ve ark. 2012; Nermes ve ark. 2013; Ezell ve ark. 2013).

Birlikte yaşayan insan ve hayvanların mikrobiyotalarında en çok benzerliğin olduğu bölge deri ve tüy bölgesidir. Mikrobiyal açıdan yetişkinlerin cilt mikrobiyotası, diğer köpeklere kıyasla kendi köpeği veya köpeklerinin mikrobiyotası ile daha benzerdir. Köpekleri olan insanlar birbirleri ile, köpekleri olmayan insanlardan daha fazla ortak bakteri filotipini paylaşırlar. Köpekleri olan, fakat birlikte yaşamayan iki insan ortalama olarak; köpekleri olmayan fakat birlikte yaşayan insanlardan daha çok ortak filotipe sahiptir (Song ve ark. 2013).

Köpekler ve sahipleri arasında en çok benzerlik gösteren taksonlar; *Betaproteobacteria* (*Methylophilaceae*) ailesi, *Actinobacteria* ailesi ve *Acidobacteria* ailesidir (Lauber ve ark. 2009).

Ev hayvanlarına prenatal maruziyeti değerlendirilen altı çalışmanın bir meta-analizinde, özellikle prenatal köpek sahipliğinde, bebeklerde alerjik hastalık (atopik dermatit, astım) riskinin azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca 24 bebekte yapılan bir pilot çalışmada ise, evcil hayvan varlığında 3 aylık bebeklerde bağırsaklarındaki mikrobiyal zenginliğinin ve çeşitliliğin daha fazla olduğu ve mikrobiyotalarının daha fazla hayvan spesifik *Bifidobacterium pseudolongum* içerdiği ortaya konmuştur ve bu hayvan-insan mikrobiyota geçişinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (Lodge ve ark. 2012; Azad ve ark. 2013; Nermes ve ark. 2013).

Ayrıca köpeklerin evcilleşip insanlarla birlikte yaşamalarını değerlendirmek amacıyla vahşi kurtlarla evcil köpeklerin bağırsak mikrobiyotalarının karşılaştırıldığı bir çalışmada kurtlarda bulunan *Alistipies*, *Pseudomonas*, *Slackia*, *Subdoligranulum*, *Eubacterium coprostanoligenes grubu* ve *Barnesiella* 'nın köpek mikrobiyotasında bulunmadığı ve bunun da vahşi atalarından farklı olarak yaşam tarzının ve in-

san etkisinin mikrobiyota üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Buna paralel olarak aynı çalışmada vahşi kurtlarda bulunmayan *Indeed*, *Dorea*, *Parabacteroides*, *Streptococcus*, *Bacteroidales* ve *Clostridiales* ailelerinin insan ve evcil köpeklerde bulunduğu ortaya konulmuştur. (Alessandri ve ark. 2019)

Antibiyotik Kullanımı

Mikrobiyota üzerine etki eden en önemli faktörlerden birisi antibiyotik kullanımıdır. Antibiyotikler sadece hedef patojene spesifik toksisiteye sahip olmayıp, mikrobiyotaya da etkileri vardır. Yapılan bir çalışmada 7 gün boyunca klindamisin uygulama sonrasında mikrobiyotadaki *Bacteroides* cinsinin 2 yıl sonra bile tam olarak normal kompozisyonuna dönemediği saptanmıştır (Jernberg ve ark. 2007).

Antibiyotik kullanımının üzerlerinde etkilerinin fazla olduğu gözlenen ana bakteri grupları arasında başlıca *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ve *Proteobacteria* grupları bulunmaktadır. Bu ana gruplardaki bazı cinsler *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, ve *Escherichia* göreceli olarak daha fazla etkilerin gözlemlendiği cinslerdir. Diğer etkilenen bakteri grupları arasında *Fusobacteria* (*Fusobacterium*), *Planctomycetes* (*Gemmata*) ve *Verrucomicrobia* (*Akkermansia*) gibi bakteri grupları bulunmaktadır (Ladirat ve ark. 2013; Panda ve ark. 2014; Ferrer ve ark. 2017).

Mikrobiyota üzerindeki en fazla etki gösteren antibiyotiklerin başında sık kullanımları nedeniyle beta-laktam ve florokinolon grubu antibiyotikler gelmektedir. Öte yandan kombine tedavi uygulamalarına da çok sık başvurulduğu için, mikrobiyom üzerinde de kombine etkiler sıklıkla oluşmaktadır (Panda ve ark. 2014).

Texas Üniversitesi Kanin Mikrobiyota Disbiyozis İndeksinin verilerine göre pek çok köpekte antibiyotik kullanımı sonrası birkaç hafta içerisinde, bağırsak mikrobiyotası eski kompozisyonuna dönmekle birlikte, bazı hayvanlarda ise bu süreç oldukça uzamaktadır (Suchodolski ve ark. 2016).

Mikrobiyota-Diyet İlişkisi

Besin bileşiminin ve yem içeriğinin, gastrointestinal fonksiyonunu, mikrobiyota bileşimini ve hayvan bağırsağındaki bakteriyel metabolik ürünlerini önemli ölçüde etkilediği bilinmektedir (Grzeškowiak ve ark. 2015).

Farklı türlerde yapılan çeşitli çalışmalar, diyet kompozisyonunun- özellikle etobur ve otçul diyetlerinde bulunanlar gibi büyük makro besin farklılıklarının farklı bağırsak mikrobiyom profilleri üzerinde

etkileri olduğunu göstermiştir (Pilla ve Suchodolski 2020).

Zorunlu etobur olarak sınıflandırılmalarına rağmen, günümüzde evcil kedi ve köpekler omnivordur ve ticari mamalarda bulunan çok çeşitli diyet karbonhidratlarını metabolize edebilmektedirler (Swanson ve ark. 2011; Rochus ve ark. 2014).

Son yıllarda köpekler için, Kemik ve Çiğ Gıda (Bone and Raw Food = BARF) diyeti olarak adlandırılan yeni bir beslenme türü oldukça popüler hale gelmiştir. BARF diyeti, pişmemiş et, kemikler ve nispeten daha düşük seviyelerde sebze, yumurta ve süt ürünlerini içerir (van Bree ve ark. 2018).

Ticari mamalar ile Kemik ve Çiğ Gıda (BARF) diyetini karşılaştıran bir çalışmada BARF diyeti ile beslenen köpeklerde *Peptostreptococcus* ve *Faecalibacterium* cinslerini içeren *Firmicutes* filumunda ve ayrıca *Bacteroides* ve *Prevotella* cinslerini içeren *Bacteroidetes* filumunda azalma görülmüştür (Schmidt ve ark 2018).

Kedilerde yapılan benzer bir çalışmada da diyetin mikrobiyota kompozisyonunu ve mikrobiyal metabolitlerin seviyesini etkilediği tespit edilmiştir (Wernimont ve ark. 2019).

Pet hayvanlarında olduğu gibi çiftlik hayvanlarında da diyetin mikrobiyota üzerine etkileri vardır. Sığırlarda diyetin mikrobiyota üzerine etkilerini değerlendirmek üzere yapılan bir çalışmada mera besisi ve toplam karışım rasyon ile beslenen sığırların rumen mikrobiyotasını incelenmiş ve rumen mikrobiyotasındaki bakteri ve arkeler üzerinde önemli farklılıklar bulunduğu ve ayrıca rumen protozoalarının diyet farklılıklarından mikrobiyotadaki bakterilerden çok daha az etkilendiği belirlenmiştir. Aile düzeyinde, toplam karışım rasyon ile beslenen hayvanlarda Fibrobacteraceae'nin ve mera besisi ile beslenen hayvanlarda ise propiyonat üreten *Veillonellaceae* yüksek bulunmuş ve mikrobiyotanın diyetle ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. (De Menezes ve ark. 2011).

Probiyotik Kullanımı

Probiyotikler "yeterli miktarda alındıklarında endojen mikrofloranın özelliklerini geliştirerek, konakçı sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmaktadır. Bir ürünün probiyotik olarak tanımlanabilmesi için, mide asiditesi ve safra asitlerine karşı dirençli olması, sindirim kanalında canlı kalabilmesi, bağırsak epiteline tutunabilmesi, mikrobiyotaya adapte olması, sindirim sisteminde kolonize olabilmesi, antimikrobiyal maddeler salgılayabilmesi (bakteriyosin gibi), patojen ve

toksik olmaması, konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkileri olması ve üretim ve depolama sırasında stabil olması, canlı kalabilmesi gerekmektedir (FAO/WHO, 2002).

Probiyotiklerin konakçı üzerinde; yağ asitleri, laktik asit ve asetik asit gibi antibakteriyel bileşiklerin üretimi, potansiyel patojenler ile besin ve bağlanma bölgeleri için rekabet etme, mikrobiyal metabolizmanın değiştirilmesi, bağıışıklığın uyarılması gibi etki şekilleri vardır (Sarowska ve ark. 2013).

Probiyotikler sitokin sentezini ve intestinal mikroflorayı düzenler. Enterositlerdeki Toll-like reseptörleri (TLR) ve proteoglikan tanıyıcı proteinlere etkilidir ve Th1 aktivasyonuna yol açarlar. Th1 sitokinleri artar ve Th2 sitokinleri azalır; böylece mukozal IgA sekresyonu, alerjen spesifik B ve T hücre yanıtı düzenlenir (Winkler ve ark. 2007). Probiyotikler, bağırsak mukozasına bağılıklarına müdahale ederek veya mukus / mün üretimini indükleyerek potansiyel patojenlerle rekabet edebilmektedirler (Collado ve ark. 2007).

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* gibi başlıca probiyotik türleri epitelyal hücrelere yapışarak patojen kolonizasyonu azaltıp aynı zamanda metabolitlerin üretimi ile patojen ve non-patojen bakteriler arasında bir denge sağlamaktadır. (De Vrese ve ark. 2008).

Tablo 3. Bazı probiyotik bakterilerin yararları.

Bakteri Adı	Yararları
<i>Lactobacilli</i> spp.	Besinlerin sindirimini ve emilimini artırır, Patojen bakterilerin kolonizasyonunu önler
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Bağıışıklık fonksiyonunu uyarır
<i>Enterococcus</i> spp.	Patojen bakterilerin üremesini engeller
<i>Bacteroides</i> spp.	Vitamin Sentezi
<i>Streptococci</i> spp.	Bağıışıklık fonksiyonunu uyarır
<i>Fusobacteria</i> spp.	Besinlerin sindirimini ve emilimini artırır
<i>Eubacterium</i> spp.	Patojen bakterilerin üremesini engeller
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Bağırsak bariyerini geliştirir, Yangıyı baskılar

Evcil hayvanlarda probiyotik kullanımının bazı yararlı etkileri; Bağıışıklık sisteminin modülasyonu,

stres durumlarına yardımcı olma, enteropatojenlerin neden olduğu enfeksiyonlardan koruma, büyüme ve gelişmede artış, alerjik hastalıkların ve son zamanlarda ise sıkça görülen obezite probleminin kontrolüdür. (Grzeškowiak ve ark. 2015).

Veteriner hekimlikte probiyotiklerin canlı üzerine olumlu etkilerini ortaya koymak üzerine yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır;

Köpeklerde yapılan çalışmalarda *Enterococcus faecium* SF68 türü uygulanan köpeklerde plasebo grubuna kıyasla fekal IgA ve distemper virüs aşısına özgü serum IgG ve IgA konsantrasyonunun daha yüksek olduğu ölçülmüştür ve ayrıca uzun süreli uygulamalarda kedilerde ve köpeklerde potansiyel bir immun modülasyon etkisinin görüldüğü ortaya konmuştur ve ayrıca köpeklerde ilk aşılama 4 hafta sonra *Enterococcus faecium* SF68 uygulanan köpeklerde lenfosit proliferasyonu ve kuduz titresinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Benyacoub ve ark. 2003). Kedi ve köpeklerde barınağa ilk getirildiğinde *E.faecium* SF68 (2.1×10^9 kob/g) uygulanan kedilerde uygulanmayanlara göre enterit ve ishal görülme yüzdesinin daha düşük olduğu, fakat köpeklerde ise bu insidanslarda bir değişme olmadığı saptanmıştır; bu veriler probiyotiklerin etkilerinin hayvan türlerine spesifik olabileceğini göstermektedir. (Bybee ve ark. 2011). Ayrıca probiyotik organizmaların kedi ve köpeklerde serum lipid ve protein seviyelerini kontrol etme potansiyelinin olduğu; probiyotik uygulaması sonucu kanda trigliserid ve albümin konsantrasyonlarında azalma şekillendirdiği, lökositlerin fagositik aktivitesinde artışın yanısıra düşük kolesterolü hayvanlarda kolesterol seviyelerinin fizyolojik seviyelere geldiği gözlemlenmiştir (Marcináková ve ark. 2006; Stropfová ve ark. 2014). Köpeklerde yangısal bağırsak hastalığında insan kaynaklı VSL#3 (*L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *Bifidobacterium infantis* ve *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* türlerini içeren bir probiyotik) 112-225 x 10^9 kob/10 kg dozunda 60 gün boyunca uygulanmış ve klinik tabloda iyileşmenin yanı sıra CD3+ T hücre infiltrasyonunda azalma ve bağırsak mikrobiyotasında normalleşme görülmüştür (Rossi ve ark. 2014).

Tablo 4. Kedi ve köpeklerde yetkilendirilmiş probiyotikler

Yetkilendirme Numarası	Katkı Adı	Hayvan Türü	Minimum içerik (Kob/kg)
4b1820	<i>Bacillus Subtilis</i> DSM 15544	Köpek	1×10^9
4b1705	<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	Kedi Köpek	7×10^9 2.5×10^9
4b1715	<i>Lactobacillus Achidophilus</i> CECT 4529	Kedi Köpek	5×10^9

Kronik böbrek hastalıklı kedi ve köpeklerde artış gösteren proteinlere bağlı üremik toksinlerden indoksil sülfat ve p-creasol'un bağırsak mikrobiyotası ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Summers ve ark. 2019). Yapılan çalışmalarda probiyotik kullanımının kronik böbrek yetmezliğinde üremik toksinler ve glomerüler filtrasyon hızı üzerine pozitif etkileri olduğu belirtilmiştir (McCain ve ark. 2011; Lippi ve ark. 2017).

Süt sığırlarında rasyona *Lactobacillus spp.*, *Ace-tobacter fabarum* ve *Candida ethanolica* içeren bir probiyotik eklenerek süt verimi ve yağın değerlendirildiği bir çalışmada probiyotik uygulanan grupta süt veriminin ve yağ oranının artma eğiliminde olduğu ortaya konulmuştur (Olchoway ve ark. 2019). Buzağılarda probiyotiklerin büyüme üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda canlı ağırlık artışı (Dar ve ark. 2017), vücut skoru (Windschitl ve ark. 1991) ve kuru madde alımında (Jatkauskas ve Vrotniakiene 2010) artışlar ortaya konulmuştur. Büyüme performansının incelendiği bir çalışmada ise *Lactobacillus acidophilus* ve prebiyotik uygulanan buzağılarda uygulanmayanlara göre büyüme performansında ciddi olumlu farklar ortaya konulmuştur (Ratre ve ark. 2019). Buzağı ishallerinde 2 ve daha çok gün probiyotik olarak *Enterococcus faecium* M74 uygulanan buzağılarda buzağı ishali görülme ortalamasının %50'den %30'a düştüğü görülmüştür (Jatkauskas ve Vrotniakiene 2010). Ayrıca aşılama ve probiyotik takviyelerinin buzağı ishalleri üzerine etkisi incelendiğinde maternal aşılama ve probiyotik kombinasyonunun tek başına maternal aşılama ve probiyotik takviyesinden daha iyi sonuçlar verdiği saptanmıştır (Avila ve ark. 1995).

Broiler civcivlerinde 14 günlük civcivlere deneysel olarak oral yolla *Eimeria tenella* ookistleri verilerek enfekte edilmiş ve 14. gün ile 35. gün arasında içme suyu ile birlikte *Pediococcus acidilactici* ve *Bacillus subtilis* içeren probiyotik (1×10^7 kob/ml dozunda) uygulanarak; yem tüketimi, canlı ağırlık ve yemden yararlanmanın yanı sıra sekum ve ileumdaki villus yüksekliği ve kript derinliği ölçülerek bir anti-koksidiyal olan salinomisin ile etkinliği karşılaştırılmıştır. Probiyotik uygulanan civcivlerin villus yükseklikleri, kript derinliği ve ayrıca canlı ağırlık artışı anti-koksidiyal grubuna göre daha olumlu bulunmuştur (Erdoğan ve ark. 2019). Broiler tavuklarında ise *Lactobacillus spp.* türlerinin *C.jejuni*'yi in vitro olarak öldürmek için yeterli miktarda laktik asit üretebildiğini ve üretilen laktik asitin *C. jejuni*'nin membran bütünlüğünü bozarak etki ettiği ortaya konulmuştur (Neal-McKinney ve ark. 2012).

Sonuç

Mikrobiyota konusu özellikle 2000'li yılların başından beri dikkat çekmeye başlamış ve keşfedilen şaşırtıcı fonksiyonları sonucu, kısa sürede kalın bağırsak "ikinci beyin" olarak adlandırılmıştır. Veteriner sahada ise mikrobiyotanın karmaşık yapısı, fonksiyonları ve organizma üzerine etkileri yeni yeni araştırılmaya ve üstüne düşünölmeye başlanmıştır.

İmmun fonksiyonlardan, endokrin sisteme, davranış fizyolojisinden gelişim ve rejenerasyona çok geniş bir etki skalası olan mikrobiyota kompozisyonu; veteriner hekimlikte de insan-hayvan etkileşimi, verim özellikleri ve sürü sağlığına etkisi, ekonomik ve toplumsal yönlerden hızla araştırılması gereken bir sahadır.

Yapılan araştırmalar, hastalıklarda doğru mikrobiyota manipölasyonlarının tedaviye katkı sağladığını ortaya koymuştur ve görünen o ki prebiyotik ve probiyotiklerin (sinbiyotik kombinasyon) potansiyel terapötik etkinliği günden güne aydınlanacaktır.

Diğer yandan, veteriner klinik pratikte çok yoğun karşılaşılan rastgele probiyotik reçete etme alışkanlığının ne derece fayda sağladığı oldukça tartışmalıdır. Pet klinik hekimliği ele alındığında, ne yazık ki henüz kedi ve köpek barsağından izole edilmiş ticari bir probiyotik müstahzarı bulunmamaktadır. Bu durumda insan probiyotikleri kullanımında, kedi ve köpek gastrointestinal asidite, kompozisyon ve arzu edilen koloni seçimi büyük önem taşımaktadır. Bir örnek vermek gerekirse, *Bifidobacterium* ailesine ait koloniler, kedi ve köpek midesindeki pH'a bağlı olarak, daha bağırsağına inmeden inaktive olmaktadır.

Güncel tıp, bilimsel çalışmaları, sağlığın anahtarının koruyucu hekimlik olduğu gerçeğı bazında şekillendirmektedir. Mikrobiyota konusunda mevcut çalışmalar, veteriner hekimlikte de mikrobiyota araştırmalarının sağlık ve ekonomik sahada önemli karşılığı olduğunu işaret etmektedir. Bu nedenle veteriner sahada gelecek perspektifinde kırılma noktası olabilme potansiyelini taşıyan mikrobiyota fenomenine, en kısa sürede daha fazla odaklanılması gerekmektedir.

Kaynaklar

- Ackerman N (2007). The canine microbiome. *Vet. Nurs. J.* 8(1). doi: 10.12968/vetn.2017.8.1.12
- Al-Asmakh M, Zadjali F. (2015) Use of Germ-Free Animal Models in Microbiota-Related Research. *J Microbiol Biotechnol.* 25, 1583-1588. doi: 10.4014/jmb.1501.01039
- Alessandri G, Milani C, Mancabelli L, Mangifesta M, Lugli GA, Viappiani A, Duranti S, Turrone F, Ossiprandi MC, van Sinderen D, Ventura M. (2019) Metagenomic dissection of the cani-

- ne gut microbiota: insights into taxonomic, metabolic and nutritional features. *Environ Microbiol.* 21, 1331-1343. doi: 10.1111/1462-2920.14540
- AlShawaqfeh MK, Wajid B, Minamoto Y, Markel M, Lidbury JA, Steiner JM, Serpedin E, Suchodolski JS. (2017) A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiol Ecol.* 1, 93. doi: 10.1093/femsec/fix136
- Apajalahti J. (2005) Comparative gut microflora, metabolic challenges, and potential opportunities. *J Appl Poult Res.* 14, 444–453. doi: 10.1093/japr/14.2.444
- Askarian F, Zhou Z, Olsen RE, Sperstad S, Ringø E. (2012) Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and in vitro growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture.* 1, 326–329.
- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y. (2011) Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science.* 331, 337–341. doi: 10.1126/science.1198469
- Avila FA, Paulillo AC, Schocken-Iturrino RP, Lucas FA, Orgaz A, Quintana JL. (1995) A comparative study of the efficiency of a probiotic and the anti-K99 and anti-A14 vaccines in the control of diarrhea in calves in Brazil. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* 48, 239–243
- Azad E., Rico DE, Derakhshani H, Havartine KJ, Khafipour E. (2015) Composition of rumen microbiota alters following diet-induced milk fat depression in dairy cows. Joint Annual Meeting of American Society of Animal Science and American Dairy Science Association, July 12–16, Orlando-FL.
- Azad MB, Konya T, Maughan H, Guttman DS, Field CJ, Sears MR, Becker AB, Scott JA, Kozyrskyj AL. (2013) Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 9, 15. doi: 10.1186/1710-1492-9-15.
- Balcázar JL, Lee NM, Pintado J, Planas M. (2010) Phylogenetic characterization and in situ detection of bacterial communities associated with seahorses (*Hippocampus guttulus*) in captivity. *Syst Appl Microbiol.* 33, 71-77. doi: 10.1016/j.syapm.2009.11.005
- Benno Y, Nakao H, Uchida K, Mitsuoka T. (1992) Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 54, 703-706.
- Benyacoub J, Czarnecki-Maulden GL, Cavadini C, Sauthier T, Anderson RE, Schiffrin EJ, von der Weid T. (2003) Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *J Nutr.* 133, 1158–1162.
- Bybee SN, Scorza AV, Lappin MR. (2011) Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter. *J Vet Intern Med.* 25, 856-860. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0738.x.
- Collado MC, Grześkowiak Ł, Salminen S. (2007) Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Curr Microbiol.* 55, 260-265. doi:10.1007/s00284-007-0144-8
- Dar A, Singh S, Palod J, Ain K, Kumar N, Farooq F. (2017) Effect of Probiotic, Prebiotic and Synbiotic on Hematological Parameters of Crossbred Calves. *Int. J. Livest. Res.* 7, 128-136.
- De Menezes AB, Lewis E, O'Donovan M, O'Neill BF, Clipson N, Doyle EM. Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiol Ecol.* 2011;78(2):256-265. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01151.x
- De Vadder F, Grasset E, Mannerås Holm L, Karsenty G, Macpherson AJ, Olofsson LE, Bäckhed F. (2018) Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19, 6458-6463. doi: 10.1073/pnas.1720017115.
- De Vrese M, Schrezenmeir J. (2008) Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 111, 1-66. doi: 10.1007/10_2008_097
- Derakhshani, H., J.C. Plaizier, and E. Khafipour. 2016. Udder microbiome in health and mastitis. ADSA, ASAS, and CSAS 2016 Joint Annual Meeting, July 19–23, Salt Lake City-UT.
- Dhanasiri AK, Brunvold L, Brinchmann MF, Korsnes K, Bergh Ø, Kiron V. (2011) Changes in the intestinal microbiota of wild Atlantic cod *Gadus morhua* L. upon captive rearing. *Microb Ecol.* 61, 20-30. doi: 10.1007/s00248-010-9673-y.
- Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A, Hibberd ML, Forsberg H, Pettersson S. (2011) Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 3047-3052. doi: 10.1073/pnas.1010529108.
- Dibner JJ, Richards JD. (2005) Antibiotic growth promoters in agriculture history and mode of action. *Poult Sci.* 84, 634–643. doi: 10.1093/ps/84.4.634
- Dickerson F, Severance E, Yolken R. (2017) The microbiome, immunity, and schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Behav Immun.* 62, 46-52. doi: 10.1016/j.bbi.2016.12.010.
- Difford GF, Plichta DR, Løvendahl P, Lassen J, Noel SJ, Højberg O, Wright AG, Zhu Z, Kristensen L, Nielsen HB, Guldbandsen B, Sahana G. (2018) Host genetics and the rumen microbiome jointly associate with methane emissions in dairy cows. *PLoS Genet.* 14(10):e1007580. doi: 10.1371/journal.pgen.1007580.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. (2005) Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science.* 308, 1635–1638.
- Erdoğan ŞZ, Gülmez N, Fındık A, Şah H, Gülmez M. (2019) Efficacy of probiotics on health status and growth performance of *Eimeria tenella* infected broiler chickens. *Kafkas Univ Vet Fak Derg,* 25, 311-320. doi: 10.9775/kvfd.2018.20889
- Ericsson AC, Personett AR, Grobman ME, Rindt H, Reinero CR. (2016) Composition and Predicted Metabolic Capacity of Upper and Lower Airway Microbiota of Healthy Dogs in Relation to the Fecal Microbiota. *PLoS One.* 11, e0154646. doi: 10.1371/journal.pone.0154646.
- Ezell JM, Wegienka G, Havstad S, Ownby DR, Johnson CC, Zoratti EM. (2013) Across-sectional analysis of pet-specific immunoglobulin E sensitization and allergic symptomatology and household pet keeping in a birth cohort population. *Allergy Asthma Proc.* 34, 504–510. doi: 10.2500/aap.2013.34.3698
- FAO/WHO. (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Food Agric Organ United Nation World Health Organ, p. 2002. Working Group Report
- Ferrer M, Méndez-García C, Rojo D, Barbas C, Moya A. (2017) Antibiotic use and microbiome function. *Biochem Pharmacol.* 134, 114-126. doi: 10.1016/j.bcp.2016.09.007
- Firkins JL, Yu Z. (2015) Ruminant nutrition symposium: how to use data on the rumen microbiome to improve our understanding of ruminant nutrition. *J Anim Sci.* 93, 1450–1470. doi: 10.2527/jas.2014-8754.
- García-Mazcorro JF, Suchodolski JS, Jones KR, Clark-Price SC, Dowd SE, Minamoto Y, Markel M, Steiner JM, Dossin O. (2012) Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiol Ecol.* 80, 642–636. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01331.x.

- Gong J, Si W, Forster RJ, Huang R, Yu H, Yin Y. (2007) 16s rRNA gene- based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: From crops to ceca. *FEMS Microbiol Ecol.* 59, 147–157. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00193.x
- Grzeškowiak Ł, Endo A, Beasley S, Salminen S. (2015) Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe.* 34, 14-23. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.04.002.
- Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, Janssen PH. (2015) Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci. Rep.* 5, 14567.
- Hesselmar B, Aberg N, Aberg B, Eriksson B, Björkstén B. (1999) Does early exposure to cat or dog protect against later allergy development?. *Clin Exp Allergy.* 29, 611–617.
- Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF, Cookson WO. (2010) Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One.* 5, e8578. doi: 10.1371/journal.pone.0008578.
- Huang YJ, Nariya S, Harris JM, Lynch SV, Choy DF, Arron JR, Boushey H. (2015) The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. *J Allergy Clin Immunol.* 136, 874–884. doi: 10.1016/j.jaci.2015.05.044.
- Human Microbiome Project Consortium. (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 13, 207-214.
- Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U. (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* 139, 485–498. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033
- Jami E, Israel A, Kotser A, Mizrahi I. (2013) Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J.* 7, 1069-1079. doi: 10.1038/ismej.2013.2.
- Jatkauskas J, Vrotniakienė V. (2010) Effects of probiotic dietary supplementation on diarrhoea patterns, faecal microbiota and performance of early weaned calves. *VET MED-CZECH.* 55, 494-503.
- Jenkins EK, Lee-Fowler TM, Angle TC, Behrend EN, Moore GE. (2016) Effects of oral administration of metronidazole and doxycycline on olfactory capabilities of explosives detection dogs. *Am J Vet Res.* 77, 906-912. doi: 10.2460/ajvr.77.8.906
- Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. (2007) Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* 1, 56-66.
- Jeurissen SH, Lewis F, Van der Klis JD, Mroz Z, Rebel JM, Ter Huurne AA. (2002) Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. *Curr Issues Intest Microbiol.* 3, 1–14.
- Jewell KA, McCormick CA, Odt CL, Weimer PJ, Suen G. (2015) Ruminant Bacterial Community Composition in Dairy Cows Is Dynamic over the Course of Two Lactations and Correlates with Feed Efficiency. *Appl Environ Microbiol.* 81, 4697-4710. doi: 10.1128/AEM.00720-15
- Kempf C, Schulz B, Strauch C. (2010) Virusnachweis in Kotproben und klinische sowie labordiagnostische Befunde von Hunden mit akutem haemorrhagischem Durchfall. *Tieraerztliche Praxis.* 38, 79–86.
- Khafipour E, Krause DO, Plaizier JC. (2009) A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *J. Dairy Sci.* 92, 1060–1070. doi: 10.3168/jds.2008-1389
- Kieler IN, Shamzir Kamal S, Vitger AD, Nielsen DS, Lauridsen C, Bjornvad CR. (2017) Gut microbiota composition may relate to weight loss rate in obese pet dogs. *Vet Med Sci.* 3, 252–262. doi: 10.1002/vms3.80
- Krause DO, Nagaraja TG, Wright AD, Callaway TR. (2013) Board-invited review: Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology. *J. Anim. Sci.* 91, 331–341. doi: 10.2527/jas.2012-5567.
- Krogh HV, Kristensen S. (1976) A study of skin diseases in dogs and cats. II. Microflora of the normal skin of dogs and cats. *Nord Vet Med.* 28, 459–463.
- Kumar S, Chen C, Indugu N, Werlang GO, Singh M, Kim WK, Thipareddi H. (2018) Effect of antibiotic withdrawal in feed on chicken gut microbial dynamics, immunity, growth performance and prevalence of foodborne pathogens. *PLoS One.* 13, 2 :e0192450. doi: 10.1371/journal.pone.0192450.
- Ladirat SE, Schols HA, Nauta A, Schoterman MH, Keijsers BJ, Montijn RC, Gruppen H, Schuren FH. (2013) High-throughput analysis of the impact of antibiotics on the human intestinal microbiota composition. *J Microbiol Methods.* 92, 387-397. doi: 10.1016/j.mimet.2012.12.011.
- Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol.* 75, 5111-5120. doi: 10.1128/AEM.00335-09.
- Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Birchler JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JI. (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320, 1647–1651. doi: 10.1126/science.1155725.
- Li F, Guan LL. (2017) Metatranscriptomic Profiling Reveals Linkages between the Active Rumen Microbiome and Feed Efficiency in Beef Cattle. *Appl Environ Microbiol.* 17, 83(9):e00061-17. doi: 10.1128/AEM.00061-17.
- Li X, Yu Y, Feng W, Yan Q, Gong Y. (2012) Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae. *J Microbiol.* 50, 29-37. doi: 10.1007/s12275-012-1340-1.
- Litonjua AA, Milton DK, Celedon JC, Ryan L, Weiss ST, Gold DR. (2002) A longitudinal analysis of wheezing in young children: the independent effects of early life exposure to house dust endotoxin, allergens, and pets. *J Allergy Clin Immunol.* 110, 736–742.
- Lippi I, Perondi F, Ceccherini G, Marchetti V, Guidi G. (2017) Effects of probiotic VSL#3 on glomerular filtration rate in dogs affected by chronic kidney disease: A pilot study. *Can Vet J.* Dec;58(12):1301-1305.
- Lodge CJ, Allen KJ, Lowe AJ, Hill DJ, Hosking CS, Abramson MJ, Dharmage SC. (2012) Perinatal cat and dog exposure and the risk of asthma and allergy in the urban environment: a systematic review of longitudinal studies. *Clin Dev Immunol.* 2012, 176484.
- Maki JJ, Klima CL, Sylte MJ, Looft T. (2019) The Microbial Pecking Order: Utilization of Intestinal Microbiota for Poultry Health. *Microorganisms.* 20, 7. doi: 10.3390/microorganisms7100376
- Marcináková M, Simonová M, Stropňová V, Lauková A. (2006) Oral application of *Enterococcus faecium* strain EE3 in healthy dogs. *Folia Microbiol (Praha).* 51, 239-242. doi:10.1007/BF02932129
- Marri PR, Stern DA, Wright AL, Billheimer D, Martinez FD. (2013) Asthma-associated differences in microbial composition of induced sputum. *J Allergy Clin Immunol.* 131, 346–352. doi: 10.1016/j.jaci.2012.11.013.
- McCain S, Allender MC, Schumacher J, Ramsay E. (2011) The effects of a probiotic on blood urea nitrogen and creatinine concentrations in large felids. *J Zoo Wildl Med.* 42, 426-429. doi: 10.1638/2010-0235.1.

- Mochizuki M, Hashimoto M, Ishida T. (2001) Recent epidemiological status of canine viral enteric infections and Giardia infection in Japan. *J Vet Med Sci.* 63, 573–575.
- Montoya-Alonso JA, Bautista-Castano I, Pena C, Suarez L, Juste MC, Tvarijonavičiute A. (2017) Prevalence of canine obesity, obesity-related metabolic dysfunction, and relationship with owner obesity in an obesogenic region of Spain. *Front Vet Sci.* 4:59. doi: 10.3389/fvets.2017.00059
- Neal-McKinney JM, Lu X, Duong T, Larson CL, Call DR, Shah DH, Konkel ME. (2012) Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. *PLoS One.* 7(9):e43928. doi: 10.1371/journal.pone.0043928.
- Nermes M, Niinivirta K, Nylund L, Laitinen K, Matomaki J, Salmi-nen S, Isolauri E. (2013) Perinatal pet exposure, faecal microbiota, and wheezy bronchitis: is there a connection?. *ISRN Allergy.* 2013, 827934. doi: 10.1155/2013/827934.
- Olchowy TWJ, Soust M, Alawneh J. (2019) The effect of a commercial probiotic product on the milk quality of dairy cows. *J Dairy Sci.* 102, 2188–2195. doi:10.3168/jds.2018-15411
- O'Mahony SM, Clarke K, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. (2015) Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res.* 277, 32–48. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.027
- Owby DR, Johnson CC, Peterson EL. (2002) Exposure to dogs and cats in the first year of life and risk of allergic sensitization at 6 to 7 years of age. *JAMA.* 288, 963–972.
- Panda S, El khader I, Casellas F, López Vivancos J, García Cors M, Santiago A, Cuenca S, Guärner F, Manichanh C. (2014) Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PLoS One.* 9, e95476. doi: 10.1371/journal.pone.0095476.
- Paz HA, Anderson CL, Muller MJ, Kononoff PJ, Fernando SC. (2016) Rumen Bacterial Community Composition in Holstein and Jersey Cows Is Different under Same Dietary Condition and Is Not Affected by Sampling Method. *Front Microbiol.* 7, 1206. doi: 10.3389/fmicb.2016.01206.
- Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA. (2009) The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 19, 2317–2323.
- Pilla R, Suchodolski JS. (2020) The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Front Vet Sci.* 14, 98. doi:10.3389/fvets.2019.00498.
- Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN, McBride BW. (2008) Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *Vet J.* 176, 21–31. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.12.016
- Plaizier JC, Li S, Tun HM, Krause DO, Khafipour E. (2017) Effects of experimentally induced subacute ruminal acidosis (SARA) on the rumen and hindgut microbiome in dairy cows. *Front Microbiol.* Jan 25, 2128.
- Ratre P, Singh RR, Chaudhary SS, Chaturvedani AK, Pavel VR, Hanumant D. (2019) Effect of prebiotic and probiotic supplementation on growth performance and body measurement in pre-ruminant Surti buffalo calves. *J. Pharm. Innov.* 8, 265–269.
- Rehman HU, Vahjen W, Awad WA, Zentek J. (2007) Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Arch Anim Nutr.* 61:319–35. doi: 10.1080/17450390701556817
- Rochus K, Janssens GP, Hesta M. (2014) Dietary fibre and the importance of the gut microbiota in feline nutrition: a review. *Nutr Res Rev.* 27, 295–307. doi:10.1017/S0954422414000213
- Rodrigues DR, Wilson KM, Trombetta M, Briggs WN, Duff AF, Chasser KM, Bottje WG, Bielke L. (2020) A Proteomic View of the Cross-Talk Between Early Intestinal Microbiota and Poultry Immune System. *Front Physiol.* 13, 11–20. doi:10.3389/fphys.2020.00020.
- Rodrigues Hoffmann A, Patterson AP, Diesel A, Lawhon SD, Ly HJ, Elkins Stephenson C, Mansell J, Steiner JM, Dowd SE, Olivry T, Suchodolski JS. (2014) The skin microbiome in healthy and allergic dogs. *PLoS One.* 9, e83197
- Rossi G, Pengo G, Caldin M, Palumbo Piccionello A, Steiner JM, Cohen ND, Jergens AE, Suchodolski JS. (2014) Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One.* 10, 9(4):e94699. doi: 10.1371/journal.pone.0094699.
- Russell JB, Rychlik JL. (2001) Factors that alter rumen microbial ecology. *Science.* 292, 1119–1122.
- Sarowska J, Choroszy-Król I, Regulska-Iłlow B, Frej-Mądrzak M, Jama-Kmieć A. (2013) The therapeutic effect of probiotic bacteria on gastrointestinal diseases. *Adv Clin Exp Med.* 22, 759–766.
- Schmidt M, Unterer S, Suchodolski JS, Honneffer JB, Guard BC, Lidbury JA, Steiner JM, Fritz J, Kölle P. (2018) The fecal microbiome and metabolome differs between dogs fed Bones and Raw Food (BARF) diets and dogs fed commercial diets. *PLoS One.* 15:13(8):e0201279. doi: 10.1371/journal.pone.0201279.
- Simpson JM, Martineau B, Jones WE, Ballam JM, Mackie RI. (2002) Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microb Ecol.* 44,186–197
- Song SJ, Lauber C, Costello EK, Lozupone CA, Humphrey G, Berg-Lyons D, Caporaso JG, Knights D, Clemente JC, Nakielny S, Gordon JI, Fierer N, Knight R. (2013) Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *Elife.* 16, :e00458. doi: 10.7554/eLife.00458.
- Strachan DP. (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 299,1259–1260. doi:10.1136/bmj.299.6710.1259
- Strompřová V, Pogány Simonová M, Gancarčíková S, Mudroňová D, Farbáková J, Mad'ari A, Lauková A. (2014) Effect of Bifidobacterium animalis B/12 administration in healthy dogs. *Anaerobe.* 28, 37–43. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.05.001.
- Suchodolski JS, Camacho J, Steiner JM. (2008) Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiol Ecol.* 66, 567–578. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00521.x
- Suchodolski JS, Dowd SE, Westermarck E, Steiner JM, Wolcott RD, Spillmann T, Harmoinen JA. (2009) The effect of the macrobiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC Microbiol.* 9, 210. doi: 10.1186/1471-2180-9-210.
- Suchodolski JS, Olson E, Honneffer JB, Guard B, Blake A, Alshawaqfeh M, Steiner JM, Barr J, Gaschen F. (2016) Effects of a hydrolyzed protein diet and metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs. *J Vet Intern Med* 30, 1455.
- Suchodolski JS. (2011) Companion animals symposium: microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *J Anim Sci.* 89, 1520–1530. doi: 10.2527/jas.2010-3377
- Summers SC, Quimby JM, Isaiah A, Suchodolski JS, Lunghofer PJ, Gustafson DL. (2019) The fecal microbiome and serum concentrations of indoxyl sulfate and p-cresol sulfate in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 33, 662–669. doi:10.1111/jvim.15389
- Swanson KS, Dowd SE, Suchodolski JS, Middelbos IS, Vester BM, Barry KA, Nelson KE, Torralba M, Henrissat B, Coutinho PM,

- Cann IK, White BA, Fahey GC Jr. (2011) Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J.* 5, 639-649. doi: 10.1038/ismej.2010.162
- Theis KR, Schmidt TM, Holekamp KE. (2012) Evidence for a bacterial mechanism for group-specific social odors among hyenas. *Sci Rep.* 2, 615
- Tizard IR, Jones SW. (2018) The microbiota regulates immunity and immunologic diseases in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 48, 307-322. doi: 10.1016/j.cvs.2017.10.008
- Tomasello G, Mazzola M, Leone A, Sinagra E, Zummo G, Farina F, Damiani P, Cappello F, Gerges Geagea A, Jurjus A, Bou Assi T, Messina M, Carini (2016) Nutrition, Oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 160, 461-466. doi: 10.5507/bp.2016.052.
- van Bree FPJ, Bokken GCAM, Mineur R, Franssen F, Opsteegh M, van der Giessen JWB, Lipman LJA, Overgaauw PAM. (2018) Zoonotic bacteria and parasites found in raw meat-based diets for cats and dogs. *Vet Rec.* 182, 50. doi: 10.1136/vr.104535
- Vientós-Plotts AI, Ericsson AC, Rindt H, Grobman ME, Graham A, Bishop K, Cohn LA, Reinero CR. (2017) Dynamic changes of the respiratory microbiota and its relationship to fecal and blood microbiota in healthy young cats. *PLoS One.* 9, e0173818. doi: 10.1371/journal.pone.0173818.
- Waite DW, Taylor MW. (2015) Exploring the avian gut microbiota: current trends and future directions. *Front Microbiol.* 3, 673. doi: 10.3389/fmicb.2015.00673.
- Wei S, Morrison M, Yu Z. (2013) Bacterial census of poultry intestinal microbiome. *Poult Sci Sympos.* 92, 671-683. doi: 10.3382/ps.2012-02822
- Wernimont S, Fritsch D, Jackson M, Badri D, Cochrane C, Gross K. (2019) Specialized Dietary Fibers Alter Microbiome Composition & Promote Fermentative Metabolism in the Lower Gastrointestinal Tract of Healthy Adult Cats (P20-045-19). *Curr Dev Nutr.* 3(Suppl 1). doi: 10.1093/cdn/nzz040.P20-045-19
- Windschitl PM, Randall KM, Brainard DJ. (1991) Growth performance of Holstein dairy calves supplemented with a probiotic. Research progress report, 22
- Winkler P, Ghadimi D, Schrezenmeier J, Kraehenbuhl JP. (2007) Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. *J Nutr.* 137, 756-772. doi: 10.1093/jn/137.3.756S
- Wold AE. (1998) The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora? *Allergy.* 53, 20-25.
- Wu J, Zhang Y, Yang H, Rao Y, Miao J, Lu X. (2016) Intestinal microbiota as an alternative therapeutic target for epilepsy. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2016:9032809. doi: 10.1155/2016/9032809
- Wu S, Wang G, Angert ER, Wang W, Li W, Zou H. (2012) Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine. *PLoS One.*;7(2):e30440. doi: 10.1371/journal.pone.0030440.
- Xenoulis PG, Palculict B, Allenspach K, Steiner JM, Van House AM, Suchodolski JS. (2008) Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiol Ecol* 66, 579-589. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00556.x
- Yegani M, Korver DR. (2008) Factors affecting intestinal health in poultry. *Poult Sci.* 87, 2052-2063. doi: 10.3382/ps.2008-00091
- Yeoman CJ, Chia N, Jeraldo P, Sipos M, Goldenfeld ND, White BA. (2012) The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Anim Health Res Rev.* 13, 89-99. doi: 10.1017/S1466252312000138
- Zitvogel L, Dailhere R, Roberti MP, Routy B, Kroemer G. (2017) Anticancer effects of the microbiome and its products. *Nat Rev Microbiol.* 15, 465-478. doi: 10.1038/nrmicro.2017.44



Yaban hayvanlarında antikoagölan rodentisitler ile zehirlenmeler

Orhan Tokur^{1*} , Abdurrahman Aksoy² 

^{1,2} Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı, Samsun, TÜRKİYE

Geliş Tarihi / Received: 22.02.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 14.04.2021

Özet: Antikoagölan rodentisitler kemirici mücadelesinde sık kullanılmaktadırlar. Tuzak yem formunda uygulanan bu maddeleri kedi, köpek gibi evcil hayvanlar ya da serçe, güvercin gibi kuşlar kazara tüketerek zehirlenebilirler. Bu durum primer (birincil) zehirlenme olarak isimlendirilir. Baykuş, tilki, çakal gibi avcı yaban hayvanları ise genellikle kemiricileri avlayarak beslenir ve tuzak yemlere ilgi göstermezler. Tuzak yemi tüketen kemiriciler anormal davranışlar sergiler; kaçış dürtüsü ve hareket kabiliyeti azalarak genellikle birkaç gün içerisinde ölürlür. Böylece avcı hayvanlar tarafından kolaylıkla yakalanabilirler. Ancak, kemiricinin vücudunda biriken antikoagölan rodentisitler avcı canlının da zehirlenmesine sebep olabilmektedir. Bu durum ise sekonder (ikincil) zehirlenme olarak isimlendirilir. Bu derlemede, hayvanlarda antikoagölan rodentisit zehirlenmeleri ile ilgili literatürde bildirilmiş veriler değerlendirilerek antikoagölan rodentisit kullanımından kaynaklanabilecek risk faktörlerini, özellikle yaban hayatı açısından aktarmak amaçlanmıştır. Değerlendirilen birçok çalışmada, Amerika, Avrupa ve Avustralya'nın çeşitli bölgelerinde yaşayan evcil ve yaban hayvanlarında hem primer hem de sekonder antikoagölan rodentisit zehirlenmesi bildirilmiş; ülkemizde ise yaban hayvanlarında antikoagölan rodentisit zehirlenmelerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Anahtar kelimeler: Antikoagölan rodentisitler, yaban hayvanları, zehirlenme

Anticoagulant rodenticide poisoning in wild animals

Abstract: Anticoagulant rodenticides are often used in rodent control. Pets such as cats, dogs, or birds such as sparrows and pigeons can be poisoned accidentally by ingesting rodenticide bait, which is regarded as primary poisoning. Wild animals such as owls, foxes, jackals, on the other hand, usually hunt rodents and have no interest in bait. When a rodent consumes an anticoagulant rodenticide bait, it exhibits abnormal behaviors such as movement disorders, reduced flight response and usually dies within a few days. As a result, predators can easily hunt the poisoned rodents. However, rodenticides that already have accumulated in the prey's body may affect the predator, leading to secondary poisoning. Secondary poisoning occurs more frequently, especially in areas where human settlement is close to the wildlife. In this review, we evaluated the published data of rodenticide poisoning in animals and showed the risks of anticoagulant rodenticides, particularly in the case of wildlife. Many studies have reported both primary and secondary rodenticide poisoning in domestic and wild animal species in many parts of Europe, America, and Australia. There is, however, no report on rodenticide poisoning in wild animals in Turkey.

Keywords: Anticoagulant rodenticides, poisoning, wild animals

Giriş

Kemirici mücadelesinde kullanılan kapan, yapışkan tuzak gibi fiziksel araçlar kısıtlı bölgelerde etkili olurken, fare ve sıçanların yoğun olarak bulunduğu kentsel ve kırsal bölgelerde, kemirici kontrolünün etkin bir şekilde sağlanabilmesi amacıyla rodentisitler kullanılmaktadır. Nörotoksik etki gösteren striknin ve brometalin, hayati organlarda kalsiyum mineralizasyonuna yol açan kolekalsiferol, vücut içerisinde zehirli fosfin gazı oluşumuna neden olan çinko fosfür gibi birçok madde genellikle tuzak yemlere katılarak rodentisit olarak kullanılmaktadır (Gupta 2018). Kemiricilerin yaşadığı bölgelere bırakılan tuzak yemlerden, bölgede yaşayan kedi, köpek, yaban

hayvanları ve kuşlar gibi hedef dışı türler de etkilenecek zehirlenebilir. Perakut zehirliliği çok yüksek olan bu maddelerin spesifik antidotu bulunmamakta ve kazara gerçekleşen zehirlenmeler genellikle ölümlü sonuçlanmaktadır (Buckle ve Eason 2015). Bir diğer rodentisit sınıfı olan antikoagölan rodentisitler (AR) ise Vitamin K epoksit redüktaz enzimini inhibe edip kan pıhtılaşma mekanizmasını bozar ve kemiricilerde iç kanamaya yol açarak ölüme sebep olurlar. Ölüm, maruz kalınan AR miktarına bağlı olmakla birlikte genellikle birkaç gün içerisinde meydana gelir (Murphy 2018). Rodentisit olarak kullanılan bazı maddeler Tablo 1.'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Rodentisit olarak kullanılan bazı maddeler.

Antikoagülan Rodentisitler	Diğer rodentisitler
Varfarin	Striknin
Bromadiolon	Brometalin
Brodifakoum	Kolekalsiferol
Koumatetralil	Sodyum florooasetat
Difenakoum	Alfa-naftil tiyoüre
Difasinon	Çinko fosfür
Klorofasinon	

Kemiriciler, neofobik karakterde canlılardır. Farklı koku ve tatlarla sahip besinlere (özellikle tuzak yemler) şüpheyle yaklaşır ve reddederek tüketmeyebilirler (Grau-Perales ve ark. 2019). Tuzak yem uygulaması yapılan bölgelerde sağ kalan kemiricilerin, daha sonra aynı yemi reddederek tekrarlayan uygulamadan etkilenmedikleri gözlenmiştir. Bu tip durumlar özellikle striknin gibi perakut zehirliliği yüksek rodentisitler kullanıldığında daha sık ortaya çıkmaktadır. AR'ler ise tuzak yem alımını takiben genellikle uzun bir zaman diliminde (4 ila 10 gün içerisinde) etkilerini göstermeye başlarlar. Bu nedenle, kemirici canlı tükettiği tuzak yem ile yaşadığı semptomlar veya zehirlenerek ölen diğer kemiriciler ara-

sında ilişki kuramaz ve ölene kadar yemi tüketmeye devam eder. Dolayısıyla AR içeren tuzak yemlerde yem reddi durumu ile nadiren karşılaşmaktadır (Barnett 1988; Macdonald ve ark. 2015). Ayrıca, kazara gerçekleşen AR zehirlenmelerinde spesifik antidot olan vitamin K₁ kullanılarak tedavi gerçekleştirilebilir. Belirtilen nedenlerle AR'ler diğer rodentisitlere oranla çok daha sık tercih edilmektedir (Eisemann ve ark. 2018).

Antikoagülan rodentisitler

Varfarin 1948 yılında AR olarak kullanılmaya başlandıktan (Hayes 1950) kısa bir süre sonra varfarin'e karşı kemiricilerde direnç geliştiği tespit edilmiştir (Boyle 1960). Bunu takiben, varfarinle yapısal olarak benzeşen klorofasinon, difasinon ve koumatetralil gibi rodentisitlere karşı direnç gelişimi birçok araştırmacı tarafından tespit edilmiştir (Greaves ve Rennison 1973; Rennison ve Dubock 1978; Martin ve ark. 1979; Buckle 2013). Birinci nesil AR'ler olarak gruplandırılan bu maddelere karşı gelişen direnç nedeniyle sonraki yıllarda daha güçlü ve etkili bileşikler sentezlenerek 2. nesil AR'ler olarak adlandırılmıştır (Buckle 2013; Mooney ve ark. 2018). Bazı 1. ve 2. nesil AR'ler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Bazı 1. ve 2. nesil antikoagülan rodentisitler ve kimyasal formülleri.

1. Nesil AR	Kimyasal Formülü	2. Nesil AR	Kimyasal Formülü
Varfarin	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	Bromadiolon	C ₃₀ H ₂₃ BrO ₄
Klorofasinon	C ₂₃ H ₁₅ ClO ₃	Brodifakoum	C ₃₁ H ₂₃ BrO ₃
Difasinon	C ₂₃ H ₁₆ O ₃	Difenakoum	C ₃₁ H ₂₄ O ₃
Koumatetralil	C ₁₉ H ₁₆ O ₃	Difethialon	C ₃₁ H ₂₃ BrO ₂ S
Koumafuril	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	Flokoumafen	C ₃₃ H ₂₅ F ₃ O ₄

İkinci nesil AR'ler oldukça lipofilik bileşiklerdir ve biyolojik yarılanma ömürleri uzundur. Birinci nesil bileşiklere oranla karaciğerde daha yoğun birikim gösterir ve enterohepatik dolaşıma girerler. Ayrıca, 2. nesil bileşikler vitamin K epoksit redüktaz enzimine daha fazla affinite gösterirler ve bu nedenle etkileri daha güçlüdür (Watt ve ark. 2005). Örneğin brodifakoum, 2. nesil AR'ler içerisinde etki gücü en yüksek bileşik olup, varfarin'den 40-200 kat daha etkilidir (King ve Tran 2015). Kemiricilerin ölümcül doza maruz kalması için 1. nesil AR içeren tuzak yemlerle birkaç kez beslenmesi gerekirken, 2. nesil AR içeren tuzak yemden bir kez tüketmesi yeterli olabilmektedir (Watt ve ark. 2005). Belirtilen üstünlükleri nedeniyle 2. nesil AR'ler süper varfarin olarak adlandırılmış fakat kullanılmaya başlandıktan bir süre sonra bu bileşiklere karşı da direnç tespit edilmiştir (Lund 1984; Gill ve ark. 1992; Blažič ve ark. 2018). Süper

varfarinler güçlü etkileriyle kemirici mücadelesindeki başarıyı artırmış; ancak aynı zamanda hedef dışı zehirlenmelerin daha tehlikeli hale gelmesine neden olmuştur.

Bu derlemenin amacı, hayvanlarda gerçekleşen antikoagülan rodentisit zehirlenme vakalarının ve literatür verilerinin incelenerek, antikoagülan rodentisit zehirlenmeleri ile ilgili risk faktörlerini özellikle yaban hayvanları açısından ortaya koymaktır.

Antikoagülan rodentisitlerle zehirlenmeler

Hedef dışı bir canlının AR içeren tuzak yemi tüketmesi primer zehirlenme olarak adlandırılır. Tuzak yemi tüketen bir canlının (kemirici, kuş, böcek vb.) başka bir canlı tarafından avlanması/yenmesi durumunda oluşan zehirlenme ise sekonder zehirlenme

olarak adlandırılır. Sekonder zehirlenmeler özellikle yaban hayvanları açısından önem arz etmektedir (Sánchez-Barbudo ve ark. 2012). Ayrıca, böcekçil canlıların AR ile kontamine böcekleri tüketmesi ve avcı canlıların da böceklerle beslenen canlıları avlaması/yemesi durumu tersiyer zehirlenme olarak adlandırılır (Brakes ve Smith 2005).

Antikoagülan rodentisitlerle primer zehirlenmeler

İnsanlarda rodentisit zehirlenmeleri kazara ya da suicidal (intihar) amaçlı gerçekleşmektedir. Tarım sektöründe çalışan işçilerin ya da pestisit uygulaması yapan personelin kazara zehirlendiği, yetişkinlerde ise intihar amaçlı rodentisit kullanımının daha yaygın olduğu bildirilmiştir (Walker ve Beach 2002; Altay ve ark. 2012; Altıparmak ve ark. 2016; Ozturk ve Ugras 2018). Ng ve ark. (2018), 4 yıllık süreçte inceledikleri 41 rodentisit zehirlenme vakasının 30'unun; Xiang ve ark. (2014), 2 yıllık süreçte gerçekleşen 24 vakadan 5'inin intihar amacıyla gerçekleştiğini bildirmiştir. Ayrıca, koruyucu ekipman kullanmadan rodentisit uygulaması yapan işçilerde, tekrarlayan dermal maruziyet sonucu zehirlenme meydana geldiği tespit edilmiştir (Svendsen ve ark. 2002; Bahadır ve ark. 2015; Özdemir ve ark. 2016). Rodentisit zehirlenme vakalarının birçoğunda 2. nesil AR'ler tespit edilmektedir. Yu ve ark. (2013), 20 adet zehirlenme vakasında 12'sinde bromadiolon, 8'inde brodifakoum tespit ederken Ng ve ark. (2018), 41 vakanın 31'inde bromadiolon tespit edildiğini aktarmışlardır.

İnsanlarda meydana gelen AR zehirlenmelerinde en fazla risk altındaki grup çocuklardır. Özellikle 1-4 yaş grubundaki çocuklar, rodentisitlere kazara maruz kalabilmektedir. Fransa'da gerçekleştirilen bir çalışmada, 4 yıllık süreçte 280 adet AR zehirlenme vakası tespit edilirken bunun %41'inin 1-4 yaş arası çocuklarda gerçekleştiği bildirilmiştir (Berny ve ark. 2010). Türkiye'de bir tıp fakültesi çocuk acil servisine, 14 aylık süre zarfında zehirlenme şüphesiyle başvuran 491 hastadan 14'ünün rodentisit zehirlenmesi yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir (Kondolot ve ark. 2009). Pestisit zehirlenmeleri ile ilgili retrospektif bir çalışmada zehirlenme vakalarının 1/3'ünün 1-4 yaş arası çocuklarda meydana geldiği ve toplam 709 vakadan 53'ünün AR'ler nedeniyle gerçekleştiği belirtilmiştir (Caldas ve ark. 2008). AR zehirlenmelerinin araştırıldığı başka bir çalışmada toplam vakaların %70'den fazlasının 5 yaşından küçük çocuklarda gerçekleştiği ortaya konulmuştur (Huntington ve ark. 2016). Çocuklarda kazara oluşan zehirlenmeler genellikle tek sefer ve az miktarda AR alımı sonucu gerçekleştiği için klinik belirtiler hafif olarak gözlen-

mekte ve çoğu zaman tedaviye gerek kalmaksızın ve bazen de profilaktik K vitamini uygulaması ile tedavi edilebilmektedir. Shepherd ve ark. (2002), bromadiolon'a maruz kalmış 6 yaş ve altı 10.762 çocukta, ölüm ya da herhangi bir ciddi klinik belirti gözlenmediğini belirtmiştir. Ancak, bazı AR'ler fetal yolla yavruya geçebilmekte ve bu durum hamilelik esnasında oluşabilecek zehirlenmeler konusunda endişe uyandırmaktadır. Morgan (2006), kumatetralil'in fetal yolla yavruya geçerek embriyotoksik ve teratojenik etkilere yol açtığını tespit etmiştir. AR'ye maruz kalmış hamile bir kadının kanında 126 ng mL⁻¹; doğumun hemen ardından yeni doğan çocuğunun kanında ise 94 ng mL⁻¹ bromadiolon saptanmış; şiddetli beyin kanaması geçiren çocuğun kurtarılamadığı bildirilmiştir (Ma ve ark. 2017). Kazara gerçekleşen zehirlenmeleri engellemek için tuzak yem istasyonlarının yapısının değiştirilmesi, çocukların ulaşamayacağı yerlerde konumlandırılması, bazı ülkelerde ise satışının kısıtlanması gibi yöntemlere başvurulmuştur. 1988 yılından itibaren tuzak yemlere katılarak kullanılan denatonyum benzoat (acı tat verici madde) kemiriciler tarafından tespit edilemezken insanlar tarafından acı olarak algılanıp oral maruziyet riskini oldukça düşürmektedir. Bu madde toksik olmamasının yanında rodentisit etkisini de engellemektedir (Kaukeinen ve Buckle 1992; Rattner ve ark. 2014; King ve Tran 2015).

Tuzak yemler, düşük AR konsantrasyonlarıyla (%0,002-%0,005) ve denatonyum benzoat ile hazırlanmakta; tuzak yem istasyonları ise genellikle 50-100 gram arası bloklar içermektedir (Johnston ve ark. 2005). AR'ler içerisinde en zehirli bileşik olarak tanımlanan brodifakoum'un %50 ölümcül doz (ÖD₅₀) değeri genel olarak köpeklerde 3,5 mg kg⁻¹, kedilerde ise 25 mg kg⁻¹ olarak belirtilmektedir (Kopanke ve ark. 2018). Kedi ve köpekler tuzak yemleri kazara yeseler dahi acı tat nedeniyle tüm bloğu tüketmez ve genellikle ölümcül olmayan miktarda rodentisite maruz kalırlar. Bu nedenle evcil hayvanlarda primer AR zehirlenmelerine nadiren rastlanmaktadır. Ancak, uygulama esnasında yapılan hatalar nedeniyle hedef dışı hayvanlar daha fazla rodentisite erişebilir ve primer olarak ölümcül dozlara maruz kalabilirler. Ayrıca, AR'ler karaciğerde yoğun olarak akümüle olabildikleri için tekrarlayan maruziyet sonucu hedef dışı canlıların vücudunda ölüme neden olabilecek miktarda AR birikebilir (Godfrey 1985; Stone ve ark. 1999). Primer AR zehirlenmeleri başta sokak hayvanları olmak üzere kedi ve köpeklerde (Berny ve ark. 2010; Kirbaş ve ark. 2012; Griggs ve ark. 2016; Thomer ve Santoro 2018) bazen de serçe, güvercin gibi avcı olmayan kuşlar ya da yaban hayvanların-

da bildirilmektedir. Sarabia ve ark. (2008), klorofasinon içeren buğday tanelerini tüketen çok sayıda güvercinin öldüğünü belirleyerek, nekropsi sonucu güvercinlerin vücudunda yoğun subkutanöz kanamalar saptamış ve kursaklarının zehirli tanelerle dolu olduğunu bildirmiştir. Tuzak yemlere maruziyet ve zehirlenme, kış mevsimi gibi yem kaynaklarının azaldığı zamanlarda daha sık şekillenmektedir. Tuzak yemlerin açık alandan ziyade kapalı kutularda sadece kemiricilerin erişebileceği şekilde dizayn edilmesi primer zehirlenme riskini azaltsa da özellikle kuşlar tuzak yem istasyonlarına kolaylıkla erişebilmektedir. Serçe, güvercin gibi küçük yapıdaki kuşlar yem istasyonlarına direkt girebilir veya uzun gagalı kuşlar dışardan yeme erişebilirler. Kuşlar aynı zamanda istasyon etrafında bulunan ve zehirli yemi tüketerek kontamine olmuş böceklerle de beslenebilirler (Vyas 2017). Ancak, sansar ya da baykuş gibi tamamen karnivor beslenme şekline sahip avcı türler tuzak yemlere genellikle ilgi göstermezler. Bu nedenle AR'lere primer olarak maruz kalma ihtimalleri oldukça zayıftır (Shore ve ark. 1999). Çiftlik hayvanlarında AR maruziyetine nadiren rastlanmasına rağmen ilgili bileşiklerin hayvansal ürünlere geçebildiğinin gösterilmesi, halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Kammerer ve ark. (1998), oral yolla varfarin uyguladıkları tavuklarda yumurta ile varfarin ekskresyonunun 14. güne kadar devam ettiğini; Vries ve Schmitz-Kummer (1994), fenprokumon'un sütle atıldığını bildirmiştir. Bazı AR aktif maddelerinin rumende yıkımlanmaması ve oral biyoyararlanım değerlerinin yüksek olması (Berny ve ark. 2006) bu maddelerin hayvansal ürünlere kalıntı olarak bulunabileceğine işaret etmektedir. Buna ek olarak Pitt ve ark. (2011), pişirme işleminin difasinon üzerine çok az etkisi olduğunu, ilgili maddenin en çok karaciğerde saptanırken ete de geçebileceğini belirtmişlerdir. Ancak, literatür araştırmasında hayvansal gıdalar aracılığıyla oluşan herhangi bir AR zehirlenmesi bildirimine rastlanmamıştır.

Antikoagülan rodentisitlerle sekonder ve tersiyer zehirlenmeler

Yaban hayatı açısından büyük risk teşkil eden sekonder zehirlenmeler, kemiricileri avlayan tilki, çakal, gelincik, vaşak gibi memeli türlerinin yanı sıra baykuş, şahin, kartal, atmaca gibi avcı kuş türlerini etkilemektedir. Özellikle kış aylarında besin sıkıntısı yaşayan gelincikler, gıda ihtiyaçlarının büyük kısmını fare ve sıçanları avlayarak karşılamaktadır (Shore ve ark. 1999; Zielinski ve ark. 2020). Kemiriciler ise yaz aylarında rahatlıkla besin bulabilirken, kış aylarında yeterince besin bulamayarak tuzak yemlere daha

çok ilgi göstermekte ve böylece soğuk mevsimlerde tuzak yemlerin etkisi artmaktadır (Lefebvre ve ark. 2017). Ayrıca, kemiriciler kış mevsiminde soğuktan korunmak için kentsel bölgelerde genel olarak kanalizasyon ve evlerde, kırsal bölgelerde ise çiftliklerde yoğunlaşmaktadır (Feng ve Himsforth 2014). Dolayısıyla insanların yoğun olarak yaşadıkları bölgelerde rodentisit kullanımı özellikle kış aylarında artmaktadır. Kırsal alanlarda yaşayan yaban hayvanlarında AR maruziyetine daha az rastlanırken, kentsel alanlara yakın bölgelerde yaşamını sürdürenlerde zehirlenme sıklığının ve örneklerde tespit edilen AR miktarının arttığı bildirilmiştir (López-Perea ve ark. 2015; Lohr 2018; López-Perea ve ark. 2019). Kemirici popülasyonunun artışı nedeniyle yoğun miktarda AR kullanılmaya başlanan bölgelerde, çevrede yaşayan hedef dışı canlıların primer ya da sekonder olarak AR'lerden etkilenme riskleri artmaktadır (Fourel ve ark. 2018). AR maruziyeti ile ilgili yaban hayvanlarında yapılan bazı tarama çalışmaları, incelenen yaban hayvanları ve numunelerde tespit edilen antikoagülan rodentisit miktarları Tablo 3'te özetlenmiştir.

Kemiriciler, avcılardan korunmak için tigmotaksi (açık alandan ziyade duvar gibi dikey yüzeylere yakın konumda yürüme) ve nokturnal yaşam gibi davranışlar geliştirmiştir. AR'lere maruz kalan kemiriciler ise açık alanda bulunma, gündüz yuva dışına çıkma, sersemlik gibi çeşitli davranış bozuklukları göstermekte (Cox ve Smith 1992); kaçış dürtülerinin azaldığı ve hareket kabiliyetlerinin düştüğü bildirilmektedir (Brakes ve Smith 2005). İlgili durumlar, avcılarının AR'den etkilenen kemiricileri daha kolay yakalamasına ve dolayısıyla sekonder zehirlenme riskinin artmasına neden olmaktadır. Sekonder zehirlenmeye katkı yapan bir diğer unsur ise özellikle 2. nesil AR'lerin karaciğerde yüksek derecede akümüle olmasıdır. Birinci nesil AR'lerin karaciğerde ortalama yarılanma ömürleri 30-55 gün iken 2. nesil bileşiklerde bu süre 220 güne kadar uzayabilmektedir (Sánchez-Barbudo ve ark. 2012). Kemirgenler, AR'lerin gecikmeli etkileri nedeniyle ölmeleri için yeterli miktardan daha fazla rodentisit tüketebilir ve bu maddeler vücutlarında birikir. AR'lere dirençli bazı kemirgenler ise, normalde ölümcül olabilecek miktardaki AR'lerden etkilenmez ve tuzak yemi tüketmeye devam eder. Böylece, vücutlarında çok daha fazla miktarda AR biriken bu dirençli kemiriciler, avcı canlılar açısından daha büyük risk oluştururlar (Smith ve Shore 2015; Blažić ve ark. 2018). AR maruziyeti sonucu şekillenen davranışsal değişiklikler avcı canlıları da etkilemektedir. Saravanan ve Kanakasabai (2004), peçeli baykuşlara, difetialon içeren yem ile beslenmiş sıçanları yedirerek baykuşları davranış değişikliği yönünden

incelemiş; subletal dozlarda ele alınmaya kayıtsızlık, sersemlik gibi davranışsal semptomlar belirlemiştir. Ayrıca, baykuşların sıçanları parçaladıkları; ancak genellikle tamamen yemedikleri bildirilmiştir. Benzer bir çalışmada brodifakoum, difenakoum, flokoumafen içeren yemle beslenmiş fareler (her bir fare sadece tek bir AR içeren yemle beslenmiş) peçeli baykuşlara sunularak bu maddelerin toksisiteleri (her bir baykuş tek bir AR'ye maruz kalmış) değerlendirilmiştir. Bu çalışmada da baykuşların fareleri parçala-

arak bir kısmını (özellikle bağırsaklar) yemediği bazen ise fareyi tamamıyla reddederek yemediği gözlenmiştir. Kümülatif olarak brodifakoum 3,3 mg/kg, difenakoum ve flokoumafen 1,9 mg/kg'a doza kadar baykuşların yaşadığı; brodifakoum 5,4 mg/kg, difenakoum 3,7 mg/kg, flokoumafen 2,2 mg/kg dozda ise ölüm gerçekleştiği tespit edilmiştir (Gray ve ark. 1994). Ancak, ilgili çalışmada inceleme yapılan baykuş sayısı yetersiz (12 adet) olduğu için kümülatif öldürücü dozlar geçeceği tam olarak yansıtılamaz.

Tablo 3. Yaban hayvanlarında tespit edilen antikoagülan rodentisit miktarları.

Tür	N	N ⁺ _(AR)	N ⁺ _(AR) > 1	ΣAR ortalama (µg/kg)	Kaynak
Vaşak (<i>Lynx rufus</i>)	39	35	27	350 (10 – 890)	(Riley ve ark. 2007)
Kır Kurdu (<i>Canis latrans</i>)	5	5	1	340 (90 – 1200)	(Poessel ve ark. 2015)
Gelincik (<i>Mustela putorius</i>)	68	54	35	120 (1 – 3162)	(Sainsbury ve ark. 2018)
Kızıl Tilki (<i>Vulpes vulpes</i>)	311	198	128	? (1 – 2433)	(Geduhn ve ark. 2015)
Balıkçıl Sansar (<i>Martes pennanti</i>)	58	46	?	? (120 – 3400)	(Gabriel ve ark. 2012)
Kaya Sansarı (<i>Martes foina</i>)	71	70	65	727 (? – 2361)	(Elmeros ve ark. 2018)
Gelincik (<i>Mustela putorius</i>)	69	65	47	242 (? – 1466)	
Kakım (<i>Mustela erminea</i>)	61	59	50	?	(Elmeros ve ark. 2011)
Bayağı Gelincik (<i>Mustela nivalis</i>)	69	65	48	(1 – 1290)	
Kızıl Kuyruklu Şahin (<i>Buteo jamaicensis</i>)	37	36	29		
Çizgili Baykuş (<i>Strix varia</i>)	24	21	10	118 (10 – 900)	(Murray 2011)
Puhu (<i>Bubo virginianus</i>)	17	17	11		
Eastern Screech Owl* (<i>Megascops asio</i>)	16	16	12		
Southern BooBook* (<i>Ninox boobook</i>)	73	53	28	310 (? - 4002)	(Lohr 2018)
Kızıl Kuyruklu Şahin (<i>Buteo jamaicensis</i>)	105	85	16	100 (10 – 950)	(Stansley ve ark. 2014)
Puhu (<i>Bubo virginianus</i>)	22	18	4		
Puhu (<i>Bubo virginianus</i>)	78	43			
Çizgili Baykuş (<i>Strix varia</i>)	25	23	67	? (1 – 1120)	(Albert ve ark. 2010)
Peçeli Baykuş (<i>Tyto alba</i>)	61	48			
Bayağı Atmaca (<i>Accipiter nisus</i>)	14	6			
Kulaklı Orman Baykuşu (<i>Asio otus</i>)	23	17			
Kızıl Enseli Doğan (<i>Falco peregrinoides</i>)	16	5	38	139 (0.1 – 702)	(Ruiz-Suárez ve ark. 2014)
Bayağı Kerkenez (<i>Falco tinnunculus</i>)	21	14			
Peçeli Baykuş (<i>Tyto alba</i>)	21	16			
Kızıl Çaylak (<i>Milvulus milvus</i>)	114	79	28	155 (?)	(Hughes ve ark. 2013)
Kızıl Tilki (<i>Vulpes vulpes</i>)	40	32	27	? (1-192)	(Seljetun ve ark. 2020)

N: İncelenen numune sayısı, **N⁺:** AR tespit edilen numune sayısı, **N⁺(AR)>1:** İçeriğinde birden fazla AR bileşiği tespit edilen örnek sayısı, **ΣARortalama:** Numunelerde saptanan ortalama rodentisit konsantrasyonu (minimum ve maksimum konsantrasyonlar)
*Türkçe karşılığı bulunamadığı için İngilizce ismi yazılmıştır.

AR toksisitesi omurgasız canlılar üzerinde daha zayıf olarak şekillenir. Omurgasız canlılar genellikle memeli ve kuşlarda toksik etkiye neden olan AR dozlarından etkilenmezler. Bu durum AR içerikli tuzak yemleri tüketen omurgasızların, böcekçil memeli ve kuş türlerinde sekonder zehirlenmeye aracılık edebilmesine neden olur (Johnston ve ark. 2005; Dowding ve ark. 2010). Spurr ve Drew (1999), AR içeren çeşitli tuzak yemlerin başta *Huberia brounii* türü karıncalar olmak üzere en az 45 farklı türden omurgasız canlı tarafından tüketildiğini saptamış ve ilgili durumun özellikle böcekçil kuşlar için sekonder zehirlenme riskine işaret ettiğini belirtmiştir. Benzer şekilde Alomar ve ark. (2018), AR tuzak yemlerinin sümüklü böcekler (*Deroceras reticulatum*) tarafından tüketilerek sümüklü böceklerin kontamine olduğunu ve bu durumun sivri fare (*Sorex araneus*), kirpi (*Erinaceus europaeus*) ve siğircık (*Sturnus vulgaris*) gibi sümüklü böceklerle beslenen canlılarda sekonder zehirlenmeye sebep olabileceğini; Booth ve ark. (2003), yer solucanlarının da benzer şekilde sekonder zehirlenmeye aracılık edebileceğini belirtmiştir. Dowding ve ark. (2010), 120 adet kirpi (*Erinaceus europaeus*) karaciğerinde AR kalıntısını araştırdıkları çalışmada 80 kirpide AR bileşiği tespit etmiş ve pozitif örneklerin 27'sinde birden fazla AR bileşiği bulunduğunu ortaya koyarak böcekçil canlılarda sekonder zehirlenmeye dikkat çekmiştir. Ancak, böcek vücudunda biriken AR miktarının düşük ve atılımının memeli ve kuşlara oranla daha hızlı gerçekleşmesi nedeniyle böceklerin sekonder/tersiyer zehirlenmelere aracılık etme riskleri oldukça düşüktür (Brooke ve ark. 2013).

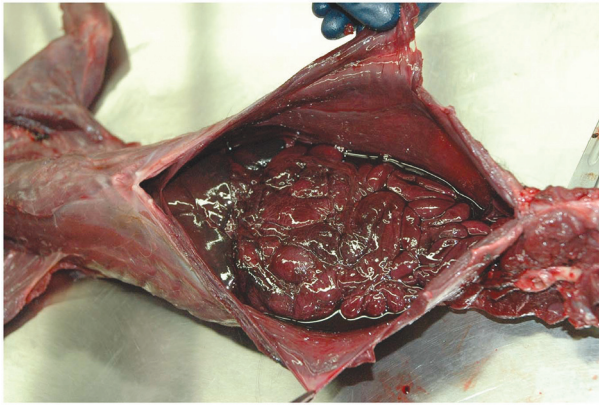
AR zehirlenmesi uyuşukluk, zayıflık, algı ve hareketin azalması, kanama gibi spesifik olmayan klinik belirtilere sahiptir. Yaban hayatına dair toplanan çoğu örnek daha önceden ölmüş hayvanlardan alındığı için ölüm sebebine işaret edebilecek lezyonlar ve bulgular kesin olarak ayırt edilememektedir. Ayrıca evcil hayvanlardaki öldürücü AR konsantrasyonlarının bilinmesine karşın yaban hayvanlarındaki öldürücü konsantrasyonlar tam olarak tespit edilmemiştir. Bu nedenlerle yaban hayvanlarında tespit edilen AR miktarları ile ölüm sebebi arasında tam bir ilişki kurulamamaktadır (Elmeros ve ark. 2011; Lefebvre ve ark. 2017; Sainsbury ve ark. 2018). Kemirgenleri avlayan baykuş, şahin gibi kuş türleri veya karnivor beslenme şekline sahip gelincik, tilki gibi memelilerin farklı tuzak yemlere ulaşma şansı oldukça düşük ve bu yemleri tüketme isteği zayıftır. Bu bağlamda sekonder zehirlenme tespitini destekleyen bulgulardan biri travmatik hasar olmaksızın gerçekleşen iç kanama iken (Şekil 1.) (Stone ve ark. 1999), ikincisi ve

en önemlisi, analiz edilen örneklerde birden fazla AR aktif maddesinin tespit edilmesidir. Christensen ve ark. (2012), 5 farklı yırtıcı ve 6 farklı baykuş türünden olmak üzere toplam 430 adet örneği analiz ederek %92'sinde AR saptamış; AR saptanan örneklerin ise %73'ünün birden fazla AR içerdiğini tespit etmiştir. Lohr (2018), 73 adet baykuş karaciğerini analiz ederek %72,6'sında tek, %38,4'ünde birden fazla AR tespit etmiş; 7 adet baykuşta ise dış bakıda herhangi bir zehirlenme belirtisi (örn; kanama) gözlemekten disseksiyon esnasında muhtemel AR kaynaklı torasik kavitede kanama, subdermal ve muskular kanamalar, ağız ve gaga çevresinde kanama gözlemlenmiştir. Sánchez-Barbudo ve ark. (2012), 2 farklı sürüngen, 18 farklı memeli ve 42 farklı kuş türünden olmak üzere toplam 401 adet evcil hayvan ve yaban hayvanını inceleyerek %38,7'sinin AR ile kontamine olduğunu; klinik belirtiler, nekropsi ve toksikolojik analizler sonucunda ise %34,9'unun AR'ler nedeniyle hayatını kaybetmiş olabileceğini bildirmiştir. Albert ve ark. (2010), çeşitli hayvanlardan elde edilen 164 örneğin %10'unda üç farklı, sadece 1 örnekte ise 4 farklı AR tespit ederken; Elmeros ve ark. (2011), inceledikleri 4 adet kakım ve gelinciğin tamamında brodifakoum, bromadiolon, kumatetralil, difenakoum, flokoumafen olmak üzere 5 farklı AR tespit etmiştir. Yaban hayatında insanla karşılaşma olasılığı düşük olan nadir türlerin de AR'lerden etkilendiği gösterilmiştir. Riley ve ark. (2007), AR zehirlenmesi nedeniyle öldüğünü belirledikleri 2 adet pumanın karaciğerlerinde sırasıyla 1,27 ve 0,51 mg/kg bromadiolon, 0,57 ve 0,31 mg/kg brodifakoum tespit etmişlerdir.

AR'lerin yavrulara aktarımının araştırıldığı bir çalışmada, tarla faresi mücadelesi yapılan kırsal bir bölgede, 40 farklı kerkenez yuvasında bulunan toplam 112 kerkenez yavrusundan alınan kanlar analiz edilerek 19 örnekte bromadiolon tespit edilmiştir. Bromadiolon'a maruz kalmış kerkenez yavrularının vücut ağırlıklarının ise maruz kalmamış olanlara göre %6,7 oranında daha zayıf olduğu belirlenmiştir (Martínez-Padilla ve ark. 2017). Gabriel ve ark. (2012), AR zehirlenmesi nedeniyle ölen bir anne sansarın, sütü aracılığıyla yavrusuna AR aktarmış olduğunu tespit etmiş; ancak yavruda AR zehirlenmesine ilişkin herhangi bir belirtiyeye rastlanmadığını bildirmiştir. Salim ve ark. (2015), bromadiolon ya da klorofasinon aktif maddelerine maruz kalan peçeli baykuşların yumurtalarında ilgili maddeleri tespit etmiş ancak bu durumun yumurta kabuğu kalınlığı ve yumurta şeklini etkilemediğini bildirmiştir.

AR'lerin yoğun kullanımı, uzun vadede bölgede yaşayan avcı türlerin sayısını da etkileyebilmektedir. Proulx ve Mackenzie (2012), yoğun ve seyrek ola-

rak rodentisit uygulanan iki farklı bölgeyi avcı yaban hayvanları sayıları yönünden karşılaştırmış; rodentisit uygulamasının az olduğu bölgedeki porsuk ve tilki sayısını yoğun olan bölgeye oranla sırasıyla 2,2 ve 6,4 kat fazla bulmuştur. Ayrıca, AR'lerin direkt etkileri dışında tuzak yem hazırlanırken kullanılan bazı yardımcı maddeler de yaban hayvanlarına zarar verebilmektedir. Özellikle pelet formundaki tuzak yemlerin hava şartlarına dayanıklılığını artırmak için eklenen parafin, bazı kuşlarda taşlık tıkanmasına (gizzard impaction) sebep olarak ölüme yol açabilmektedir (Blus ve ark. 1985; Vyas 2017).



Şekil 1. Ölümcül AR maruziyeti sonucu torasik kavitede yoğun kan birikimi (Gabriel ve ark. 2012).

Yaban hayatında AR maruziyetini belirlemek için yapılabilecek geniş çaplı çalışmalarda, ölü hayvanları bulmak veya incelenecek hayvanların ölmesini beklemek uzun ve yorucu bir çabadır. Bu nedenle tarama çalışmalarında ana örnek olan karaciğer yerine dışkıda bulunan AR'lerin araştırılabileceği ileri sürülmüştür. Ancak, taze dışkı örneklerinin analizi gerçek değerleri yansıtsa da hava koşullarına bağlı olarak AR konsantrasyonunun hızla düştüğü ve üzerinden uzun zaman geçmiş örneklerin gerçek maruziyeti yansıtmadığı belirtilmiştir (Prat-Mairet ve ark. 2017; Fourel ve ark. 2018; Seljetun ve ark. 2018). AR zehirlenmesi tespitine yönelik çalışmalarda karaciğere diğer bir alternatif olarak Newton ve ark. (1994), baykuşların beslenme sonrası regurgitasyon ile çıkardıkları besin artıklarının kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Sonuç

Tuzak yemlerde bulunan AR konsantrasyonları oldukça düşüktür. Acı tat verici maddeler ise kazara oluşabilecek yem tüketimini sınırlamaktadır. Bu nedenle kedi, köpek gibi evcil hayvanlarda kasıtlı eylemler dışında primer AR zehirlenme insidansı

düşüktür. Sekonder zehirlenme bakımından yaban hayvanlarının ölümcül doza maruz kalabilmesi ise AR ile kontamine çok sayıda kemirici tüketmesi ile ancak mümkün olmaktadır. Bu nedenle özellikle yaban hayatında gerçekleşen AR zehirlenmelerinin ölümcül etkilerinden çok davranışsal, reproduktif ve hormonal bozukluklar ile ilgili çeşitli subletal etkilerinin açığa çıkarılması gerekmektedir. AR zehirlenmesinin kolaylıkla tedavi edilebilir olması, genel olarak insektisit ve herbisit zehirlenmelerine nispeten daha hafif seyretmesi, insan ve evcil hayvanlarda zehirlenme riskini düşüren başlıca etkenler arasında yer almaktadır. Ancak, yaban hayvanları ve dolayısıyla ekosistem açısından özellikle sekonder zehirlenme riski halen yüksektir. Evcil hayvanlar ve insanlarda gerçekleşen zehirlenmelere dair kayıtlar düzenli olarak tutulabilmekte iken yaban hayvanlarında gerçekleşen zehirlenmeler ancak tarama çalışmaları sonucu ortaya çıkmakta, birçok zehirlenme vakası muhtemelen gözden kaçırılmaktadır. Yapılan literatür taraması sonucu, ülkemizde yaban hayvanlarında AR kalıntısı araştırılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla ülkemizde yaşayan yaban hayvanlarının AR maruziyetinin belirlenmesi ve zehirlenme nedenlerinin ortaya çıkarılabilmesi için çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

Maddi destek ve çıkar ilişkisi: Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkarı dayalı ilişkisi yoktur.

Kaynaklar

- Albert CA, Wilson LK, Mineau P, Trudeau S, Elliott JE. (2010). Anticoagulant rodenticides in three owl species from western Canada, 1988–2003. *Arch Environ Contam Toxicol.* 58(2), 451-459. doi: <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9402-z>.
- Alomar H, Chabert A, Coeurdassier M, Vey D, Berny P. (2018). Accumulation of anticoagulant rodenticides (chlorofacinone, bromadiolone and brodifacoum) in a non-target invertebrate, the slug, *Deroceras reticulatum*. *Sci Total Environ.* 610, 576-582. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.117>.
- Altay S, Velibey Y, Cakmak HA, Boz GC, Koca S. (2012). Prolonged coagulopathy related to coumarin rodenticide in a young patient: superwarfarin poisoning: case report-online article. *Cardiovasc J Afr.* 23(9), 9-11.
- Altıparmak B, Uysal AI, Tarakçı E, Sahan L, Demirbilek S. (2016). Rodentisit (fare zehiri) ve etilen glikol (antifriz) ile intihar girişimi. *J Anesth.* 24(3), 200-203.
- Bahadır A, Akca Ö, Bülbül İ, Kahveci R, Özkara A. (2015). Superwarfarinin cilt emilimi sonucu ortaya çıkan INR yüksekliği ve vitamin K eksikliği: Olgu sunumu. *Medeniyet Med J.* 30(2), 99-101. doi: <https://doi.org/10.5222/MMJ.2015.099>.
- Barnett S. (1988). Exploring, sampling, neophobia, and feeding. Prakash I. eds. *Rodent pest management*. CRC press, Boca Raton. p. 296-317.
- Berny P, Velardo J, Pulce C, D'amico A, Kammerer M, Lasseur R. (2010). Prevalence of anticoagulant rodenticide poisoning in humans and animals in France and substances involved. *Clin*

- Toxicol.* 48(9), 935-941. doi: <https://doi.org/10.3109/15563650.2010.533678>.
- Berny PJ, de Oliveira LA, Videmann B, Rossi S. (2006). Assessment of ruminal degradation, oral bioavailability, and toxic effects of anticoagulant rodenticides in sheep. *Am J Vet Res.* 67(2), 363-371. doi: <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.2.363>.
- Blažič T, Jokić G, Götz M, Esther A, Vukša M, Đedović S. (2018). Brodifacoum as a first choice rodenticide for controlling bromadiolone-resistant *Mus musculus*. *J Stored Prod Res.* 79, 29-33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2018.08.006>.
- Blus LJ, Henny CJ, Grove RA. (1985). Effects of pelletized anticoagulant rodenticides on California quail. *J Wildl Dis.* 21(4), 391-395. doi: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-21.4.391>.
- Booth L, Fisher P, Heppelthwaite V, Eason C. (2003). Toxicity and residues of brodifacoum in snails and earthworms. *DOC Science Internal Series.* 143, 5-14.
- Boyle CM. (1960). Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to anticoagulant poisons. *Nature.* 188(4749), 517. doi: <https://doi.org/10.1038/188517a0>.
- Brakes C, Smith RH. (2005). Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning. *J Appl Ecol.* 42(1), 118-128. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2005.00997.x>.
- Brooke MdL, Cuthbert R, Harrison G, Gordon C, Taggart M. (2013). Persistence of brodifacoum in cockroach and woodlice: implications for secondary poisoning during rodent eradications. *Ecotoxicol Environ Saf.* 97, 183-188. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.08.007>.
- Buckle A. (2013). Anticoagulant resistance in the United Kingdom and a new guideline for the management of resistant infestations of Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.). *Pest Manag Sci.* 69(3), 334-341. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.3309>.
- Buckle AP, Eason C. (2015). Control methods: chemical. Buckle A, Smith R. eds. *Rodent pests and their control*. CAB International, United Kingdom. p. 123-154
- Caldas ED, Rebelo FM, Heliodoro VO, Magalhães AF, Rebelo RM. (2008). Poisonings with pesticides in the Federal District of Brazil. *Clin Toxicol.* 46(10), 1058-1063. doi: <https://doi.org/10.1080/15563650802530443>.
- Christensen TK, Lassen P, Elmeros M. (2012). High exposure rates of anticoagulant rodenticides in predatory bird species in intensively managed landscapes in Denmark. *Arch Environ Contam Toxicol.* 63(3), 437-444. doi: <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9771-6>.
- Cox P, Smith R. (1992). Rodenticide ecotoxicology: pre-lethal effects of anticoagulants on rat behaviour. Proceedings of the Fifteenth Vertebrate Pest Conference, March 3-5, California-USA.
- Dowding CV, Shore RF, Worgan A, Baker PJ, Harris S. (2010). Accumulation of anticoagulant rodenticides in a non-target insectivore, the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Environmental Pollution.* 158(1), 161-166. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.07.017>.
- Eisemann JD, Fisher PM, Buckle A, Humphrys S. (2018). An International Perspective on the Regulation of Rodenticides. Van den Brink NW, Elliott JE, Shore RF, Rattner BA eds. *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife*. Springer Inc., p. 287-318.
- Elmeros M, Christensen TK, Lassen P. (2011). Concentrations of anticoagulant rodenticides in stoats *Mustela erminea* and weasels *Mustela nivalis* from Denmark. *Sci Total Environ.* 409(12), 2373-2378. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.03.006>.
- Elmeros M, Lassen P, Bossi R, Topping CJ. (2018). Exposure of stone marten (*Martes foina*) and polecat (*Mustela putorius*) to anticoagulant rodenticides: Effects of regulatory restrictions of rodenticide use. *Sci Total Environ.* 612, 1358-1364. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.034>.
- Feng AY, Himsforth CG. (2014). The secret life of the city rat: a review of the ecology of urban Norway and black rats (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*). *Urban Ecosyst.* 17(1), 149-162. doi: <https://doi.org/10.1007/s11252-013-0305-4>.
- Fourrel I, Sage M, Benoit E, Lattard V. (2018). Liver and fecal samples suggest differential exposure of red fox (*Vulpes vulpes*) to trans- and cis-bromadiolone in areas from France treated with plant protection products. *Sci Total Environ.* 622, 924-929. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.053>.
- Gabriel MW, Woods LW, Poppenga R, Sweitzer RA, Thompson C, Matthews SM, Higley JM, Keller SM, Purcell K, Barrett RH. (2012). Anticoagulant rodenticides on our public and community lands: spatial distribution of exposure and poisoning of a rare forest carnivore. *PLoS One.* 7(7), e40163. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040163>.
- Geduhn A, Jacob J, Schenke D, Keller B, Kleinschmidt S, Esther A. (2015). Relation between intensity of biocide practice and residues of anticoagulant rodenticides in red foxes (*Vulpes vulpes*). *PLoS One.* 10(9), e0139191. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139191>.
- Gill JE, Kerins GM, MacNicoll AD. (1992). Inheritance of low grade brodifacoum resistance in the Norway rat. *J Wildl Manag.* 809-816. doi: <https://doi.org/10.2307/3809478>.
- Godfrey M. (1985). Non-target and secondary poisoning hazards of "second generation" anticoagulants. *Acta Zool Fenn.* 173, 209-212.
- Grau-Perales A, Levy E, Fenton A, Gallo M. (2019). Dorsal hippocampal damage disrupts the auditory context-dependent attenuation of taste neophobia in mice. *Neurobiol Learn Mem.* 157, 121-127. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.12.009>.
- Gray A, Eadsforth CV, Dutton AJ, Vaughan JA. (1994). The toxicity of three second-generation rodenticides to Barn Owls. *Pestic Sci.* 42(3), 179-184. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.2780420307>.
- Greaves J, Rennison B. (1973). Population aspects of warfarin resistance in the brown rat, *Rattus norvegicus*. *Mammal Review.* 3(2), 27-29. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1973.tb00166.x>.
- Griggs AN, Allbaugh RA, Tofflemire KL, Ben-Shlomo G, Whitley D, Paulsen ME. (2016). Anticoagulant rodenticide toxicity in six dogs presenting for ocular disease. *Vet Ophthalmol.* 19(1), 73-80. doi: <https://doi.org/10.1111/vop.12267>.
- Gupta RC. (2018). Non-anticoagulant rodenticides. Gupta R. eds. *Veterinary Toxicology*. Elsevier Inc. p. 613-626.
- Hayes WJ. (1950). Control of Norway rats with residual rodenticide warfarin. *Public Health Rep.* 65(47), 1537-1555.
- Hughes J, Sharp E, Taylor M, Melton L, Hartley G. (2013). Monitoring agricultural rodenticide use and secondary exposure of raptors in Scotland. *Ecotoxicology.* 22(6), 974-984. doi: <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1074-9>.
- Huntington S, Fenik Y, Vohra R, Geller RJ. (2016). Human bromethalin exposures reported to a US statewide poison control system. *Clin Toxicol.* 54(3), 277-281. doi: <https://doi.org/10.3109/15563650.2016.1139713>.
- Johnston JJ, Pitt WC, Sugihara RT, Eisemann JD, Primus TM, Holmes MJ, Crocker J, Hart A. (2005). Probabilistic risk assessment for snails, slugs, and endangered honeycreepers in diphacinone rodenticide baited areas on Hawaii, USA. *Environ Toxicol Chem.* 24(6), 1557-1567. doi: <https://doi.org/10.1897/04-255R.1>.

- Kammerer M, Pouliquen H, Pinault L, Loyau M. (1998). Residues depletion in egg after warfarin ingestion by laying hens. *Vet Hum Toxicol.* 40(5), 273-275.
- Kaukeinen DE, Buckle AP. (1992). Evaluations of aversive agents to increase the selectivity of rodenticides, with emphasis on denatonium benzoate (Bitrex®) bittering agent. Proceedings of the Fifteenth Vertebrate Pest Conference, March 3-5, California-USA.
- King N, Tran M-H. (2015). Long-acting anticoagulant rodenticide (superwarfarin) poisoning: a review of its historical development, epidemiology, and clinical management. *Transfus Med Rev.* 29(4), 250-258. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2015.06.002>.
- Kırbaş A, Özkanlar Y, Özkanlar S, Aktaş M. (2012). Bir köpekte şiddetli burun kanaması ile seyreden varfarin toksikasyonu. *Ataturk Univ Vet Bilim Derg.* 7(3), 201-209.
- Kondolot M, Akyıldız B, Görözen F, Kurtoğlu S, Patroğlu T. (2009). Çocuk acil servisine getirilen zehirlenme olgularının değerlendirilmesi. *Cocuk Sagligi ve Hastalıkları Derg.* 52(2), 68-64.
- Kopanke JH, Horak KE, Musselman E, Miller CA, Bennett K, Oliver CS, Volker SF, VandeWoude S, Bevins SN. (2018). Effects of low-level brodifacoum exposure on the feline immune response. *Sci Rep.* 8(1), 1-13. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26558-3>.
- Lefebvre Sb, Fourel I, Queffelec S, Vodovar D, Megarbane B, Benoit E, Siguret V, Lattard V. (2017). Poisoning by anticoagulant rodenticides in humans and animals: causes and consequences. *IntechOpen*, p. 11-32. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69955>.
- Lohr MT. (2018). Anticoagulant rodenticide exposure in an Australian predatory bird increases with proximity to developed habitat. *Sci Total Environ.* 643, 134-144. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.207>.
- López-Perea JJ, Camarero PR, Molina-López RA, Parpal L, Obón E, Solá J, Mateo R. (2015). Interspecific and geographical differences in anticoagulant rodenticide residues of predatory wildlife from the Mediterranean region of Spain. *Sci Total Environ.* 511, 259-267. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.042>.
- López-Perea JJ, Camarero PR, Sánchez-Barbudo IS, Mateo R. (2019). Urbanization and cattle density are determinants in the exposure to anticoagulant rodenticides of non-target wildlife. *Environ Pollut.* 244, 801-808. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.101>.
- Lund M. (1984). Resistance to the second-generation anticoagulant rodenticides. Proceedings of the Eleventh Vertebrate Pest Conference, March 6-8, California-USA.
- Ma M, Zhang M, Tang X, Li Z. (2017). Massive neonatal intracranial hemorrhage caused by bromadiolone: A case report. *Medicine.* 96(45). doi: <https://dx.doi.org/10.1097%2FMD.00000000000008506>
- Macdonald D, Gelling M. (2015). The natural history of rodents: preadaptations to pestilence. Buckle A, Smith R. eds. *Rodent pests and their control*. CAB International, United Kingdom. p. 1-18.
- Martin A, Steed LC, Redfern R, Gill J, Huson L. (1979). Warfarin-resistance genotype determination in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Lab Anim.* 13(3), 209-214. doi: <https://doi.org/10.1258%2F002367779780937852>.
- Martínez-Padilla J, López-Idiáquez D, López-Perea JJ, Mateo R, Paz A, Viñuela J. (2017). A negative association between bromadiolone exposure and nestling body condition in common kestrels: management implications for vole outbreaks. *Pest Manag Sci.* 73(2), 364-370. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.4435>.
- Mooney J, Lynch MR, Prescott CV, Clegg T, Loughlin M, Hannon B, Moore C, Faulkner R. (2018). VKORC1 sequence variants associated with resistance to anticoagulant rodenticides in Irish populations of *Rattus norvegicus* and *Mus musculus domesticus*. *Sci Rep.* 8(1), 4535. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22815-7>
- Morgan AM. (2006). Teratogenic effect of the coumarinic anticoagulant rodenticide, racumin in white rats. *J Egypt Soc Toxicol.* 34, 5-14.
- Murphy MJ. (2018). Anticoagulant rodenticides Gupta R. eds. *Veterinary Toxicology*. Elsevier Inc. p. 583-612.
- Murray M. (2011). Anticoagulant rodenticide exposure and toxicosis in four species of birds of prey presented to a wildlife clinic in Massachusetts, 2006–2010. *J Zoo Wildl Med.* 42(1), 88-97. doi: <https://doi.org/10.1638/2010-0188.1>.
- Newton I, Wyllie I, Gray A, Eadsforth CV. (1994). The toxicity of the rodenticide flocoumafen to barn owls and its elimination via pellets. *Pestic Sci.* 41(3), 187-193. doi: <https://doi.org/10.1002/ps.2780410304>.
- Ng WY, Ching CK, Chong YK, Ng SW, Cheung WL, Mak TWL. (2018). Retrospective study of the characteristics of anticoagulant-type rodenticide poisoning in Hong Kong. *J Med Toxicol.* 14(3), 212-228. doi: <https://doi.org/10.1007/s13181-018-0660-x>.
- Ozturk Z, Ugras K. (2018). Pregnancy outcomes after suicide attempts by self-poisoning and drug overdose: experience of a clinical pharmacology consultation service in Izmir, Turkey. *J Obstet Gynaecol.* 38(7), 1026-1028. doi: <https://doi.org/10.1080/01443615.2017.1419463>.
- Özdemir ZN, Şahin U, Merter M, Gündüz M, Ateşgaoğlu B, Bektaş M. (2016). A case of superwarfarin poisoning due to repetitive occupational dermal rodenticide exposure in a worker. *Turk J Hematol.* 33(3), 251-253. doi: <https://dx.doi.org/10.4274%2Ftjh.2015.0433>.
- Pitt WC, Higashi M, Primus TM. (2011). The effect of cooking on diphacinone residues related to human consumption of feral pig tissues. *Food Chem Toxicol.* 49(9), 2030-2034. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.05.014>.
- Poessel SA, Breck SW, Fox KA, Gese EM. (2015). Anticoagulant rodenticide exposure and toxicosis in coyotes (*Canis latrans*) in the Denver metropolitan area. *J Wildl Dis.* 51(1), 265-268. doi: <https://doi.org/10.7589/2014-04-116>.
- Prat-Mairet Y, Fourel I, Barrat J, Sage M, Giraudoux P, Coeurdassier M. (2017). Non-invasive monitoring of red fox exposure to rodenticides from scats. *Ecol Indic.* 72, 777-783. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.08.058>.
- Proulx G, Mackenzie N. (2012). Relative abundance of American badger (*Taxidea taxus*) and red fox (*Vulpes vulpes*) in landscapes with high and low rodenticide poisoning levels. *Integr Zool.* 7(1), 41-47. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2011.00276.x>.
- Rahman NA, Das S, Chaudhari VA, Nandagopal S, Badhe B. (2017). Blending of rodenticide and battery acid—a rare and fatal suicide mix. *Egypt J Forensic Sci.* 7, 1-5. doi: 10.1186/s41935-017-0002-1
- Rattner BA, Lazarus RS, Elliott JE, Shore RF, van den Brink N. (2014). Adverse outcome pathway and risks of anticoagulant rodenticides to predatory wildlife. *Environ Sci Technol.* 48(15), 8433-8445. doi: <https://doi.org/10.1021/es501740n>.
- Rennison BD, Dubock A. (1978). Field trials of WBA 8119 (PP 581, brodifacoum*) against warfarin-resistant infestations of Rat-

- tus norvegicus. *Epidemiol Infect.* 80(1), 77-82. doi: <https://doi.org/10.1017/S0022172400053419>.
- Riley SP, Bromley C, Poppenga RH, Uzal FA, Whited L, Sauvajot RM. (2007). Anticoagulant exposure and notoedric mange in bobcats and mountain lions in urban southern California. *J Wildl Manag.* 71(6), 1874-1884. doi: <https://doi.org/10.2193/2005-615>.
- Ruiz-Suárez N, Henríquez-Hernández LA, Valerón PF, Boada LD, Zumbado M, Camacho M, Almeida-González M, Luzardo OP. (2014). Assessment of anticoagulant rodenticide exposure in six raptor species from the Canary Islands (Spain). *Sci Total Environ.* 485, 371-376. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.094>.
- Sainsbury KA, Shore RF, Schofield H, Croose E, Pereira MG, Sleep D, Kitchener AC, Hantke G, McDonald RA. (2018). Long-term increase in secondary exposure to anticoagulant rodenticides in European polecats *Mustela putorius* in Great Britain. *Environ Pollut.* 236, 689-698. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.004>.
- Salim H, Noor HM, Hamid NH, Omar D, Kasim A, Abdin C. (2015). The effects of rodenticide residues deposited in eggs of *Tyto alba* to eggshell thickness. *Sains Malays.* 44, 559-564.
- Sánchez-Barbudo IS, Camarero PR, Mateo R. (2012). Primary and secondary poisoning by anticoagulant rodenticides of non-target animals in Spain. *Sci Total Environ.* 420, 280-288. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.028>.
- Sarabia J, Sánchez-Barbudo I, Siqueira W, Mateo R, Rollán E, Pizarro M. (2008). Lesions associated with the plexus venosus subcutaneus collaris of pigeons with chlorophacinone toxicosis. *Avian Dis.* 52(3), 540-543. doi: <https://doi.org/10.1637/8251-020508-Case.1>.
- Saravanan K, Kanakasabai R. (2004). Evaluation of secondary poisoning of difethialone, a new second-generation anticoagulant rodenticide to Barn owl, *Tyto alba Hartert* under captivity. *Indian J Exp Biol.* 42, 1013-1016.
- Seljetun KO, Eliassen E, Karinen R, Moe L, Vindenes V. (2018). Quantitative method for analysis of six anticoagulant rodenticides in faeces, applied in a case with repeated samples from a dog. *Acta Vet Scand.* 60(1), 3. doi: <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0357-9>.
- Seljetun KO, Sandvik M, Vindenes V, Eliassen E, Øiestad EL, Madslien K, Moe L. (2020). Comparison of anticoagulant rodenticide concentrations in liver and feces from apparently healthy red foxes. *J Vet Diagn Invest.* 32(4), 560-564. doi: <https://doi.org/10.1177%2F1040638720927365>.
- Shepherd G, Klein-Schwartz W, Anderson BD. (2002). Acute, unintentional pediatric brodifacoum ingestions. *Pediatr Emerg Care.* 18(3), 174-178.
- Shore RF, Birks JD, Freestone P. (1999). Exposure of non-target vertebrates to second-generation rodenticides in Britain, with particular reference to the polecat *Mustela putorius*. *N Z J Ecol.* 23(2), 199-206.
- Smith R, Shore R. (2015). Environmental Impacts of Rodenticides. Buckle A, Smith R. eds. *Rodent pests and their control*. CAB International, United Kingdom. p. 330-345.
- Spurr E, Drew K. (1999). Invertebrates feeding on baits used for vertebrate pest control in New Zealand. *N Z J Ecol.* 23(2), 167-173.
- Stansley W, Cummings M, Vudathala D, Murphy LA. (2014). Anticoagulant rodenticides in red-tailed hawks, *Buteo jamaicensis*, and great horned owls, *Bubo virginianus*, from New Jersey, USA, 2008-2010. *Bull Environ Contam Toxicol.* 92(1), 6-9. doi: <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1135-z>.
- Stone WB, Okoniewski JC, Stedelin JR. (1999). Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York. *J Wildl Dis.* 35(2), 187-193. doi: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-35.2.187>.
- Svensden S, Kolstad HA, Steesby E. (2002). Bleeding problems associated with occupational exposure to anticoagulant rodenticides. *Int Arch Occup Environ Health.* 75(7), 515-517. doi: <https://doi.org/10.1007/s00420-002-0339-z>.
- Thomer AJ, Santoro KB. (2018). Anticoagulant rodenticide toxicosis causing tracheal collapse in 4 small breed dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 28(6), 573-578. doi: <https://doi.org/10.1111/vec.12774>.
- Vries de JX, Schmitz-Kummer E. (1994). Determination of the coumarin anticoagulant phenprocoumon and metabolites in human plasma, urine and breast milk by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 655(1), 63-71. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(94\)00050-6](https://doi.org/10.1016/0378-4347(94)00050-6).
- Vyas NB. (2017). Rodenticide incidents of exposure and adverse effects on non-raptor birds. *Sci Total Environ.* 609, 68-76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.004>.
- Walker J, Beach F. (2002). Deliberate self-poisoning with rodenticide: a diagnostic dilemma. *Int J Clin Pract.* 56(3), 223-224.
- Watt BE, Proudfoot AT, Bradberry SM, Vale JA. (2005). Anticoagulant rodenticides. *Toxicol Rev.* 24(4), 259-269. doi: <https://doi.org/10.2165/00139709-200524040-00005>.
- Xiang L, Min Z, Alan Z, Yaohui W. (2014). Retrospective study of twenty-four patients with prolonged coagulopathy due to long-acting anti-vitamin K rodenticide poisoning. *Am J Med Sci.* 347(4), 299-304. doi: <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e318291cb7d>.
- Yu H-Y, Lin J-L, Fu J-F, Lin J-H, Liu S-H, Weng C-H, Huang W-H, Chen K-H, Hsu C-W, Yen T-H. (2013). Outcomes of patients with rodenticide poisoning at a far east poison center. *SpringerPlus.* 2(1), 505. doi: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-505>.
- Zielinski WJ, Linnell MA, Schwartz MK, Pilgrim K. (2020). Exploiting the winter trophic relationship between weasels (*Mustela spp.*) and their microtine prey as a survey method for weasels in meadow ecosystems. *Northwest Sci.* 93(3-4), 185-192. doi: <https://doi.org/10.3955/046.093.0303>



Resmi gıda kontrollerinde Covid-19 tedbirlerine yönelik ilave gereklilikler

Sibel Özçakmak¹

¹Atakum Tarım ve Orman İlçe Müdürlüğü, Samsun, Türkiye

Sayın Editör,

Covid-19 tedbirlerinin Ek.4 Onaylı/Kayıtlı İşletmelere Ait Resmi Kontrol Formuna dâhil edilmesi her iki kanunun uygulanabilirliğinin kontrolü ve idari yaptırımlar açısından önemli kolaylıklar sağlayacağını düşündüğüm **“Resmi Gıda Kontrollerinde Covid-19 tedbirlerine Yönelik İlave Gereklilikler”** başlıklı çalışmamla ilgili bazı görüşlerimi paylaşmak istiyorum.

Bireysel ve sosyal hayatlarımız üzerinde ani ve beklenmedik etkilere yol açan pandemi döneminde, salgının/ bulaşın toplum sağlığı ve kamu düzeni açısından oluşturduğu *riski yönetme, sosyal izolasyonu temin, sosyal mesafeyi koruma ve salgının/bulaşın yayılım hızını kontrol altında tutma* amacıyla birçok tedbir kararları alınarak uygulamaya geçirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü, virüsün bulaşması ve yayılmasının engellenmesi için kamuoyuna yönelik genel tavsiyeler yayınlamıştır. Ülkemizde de bu doğrultuda, hayatın her alanına yönelik uyulması gereken kurallar ve önlemler; Sağlık Bakanlığı ve Koronavirüs Bilim

Kurulunun önerileri, Cumhurbaşkanı talimatları doğrultusunda belirlenerek uygulamaya geçirmektedir.

Kamu otoritelerinin Covid-19'u önlemeye yönelik kurallarının çoğu genel hijyen ilkelerine dayanmaktadır. İşletme yetkilileri ve çalışanları, faaliyette oldukları sürece Yeni Koronavirüs hastalığına karşı işyerlerinde etkin mücadele için kamu otoritesi tarafından bildirilen tedbirlere uymak zorundadır. Gıda işletmelerinin pandemi sürecinde 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri Bitki Sağlığı Gıda ve Yem Kanunu'na ve 1593 sayılı Genel Hijyen Kanununa (Umumi Hıfzıssıhha Kanunu) uyması gerekmektedir. Denetim ve kontrollerde gıda operasyonlarının emniyetli koşullarda sağlanması, belirlenen kontrol önlemlerinin alınması ve tüm bu işlemlerin sürekliliği hedeflenmektedir. Resmi incelemelerde sadece gıda güvenliği kriterleri değil, Covid-19 hastalığının yayılmasını önlemek için ek önlemler de dikkate alınmaktadır (Anonim 2010; Anonim, 2011; Anonim, 2020). Bu öngörü ile Onaylı/Kayıtlı İşletmelere Ait Resmi Kontrol Formu'na yapmış olduğum ilaveler, bilgilerinize sunulmuştur. Önümüzdeki dönemlerde bir katkı olarak değerlendirilmesini ümit ediyorum.

Çizelge 1. Resmi Gıda Kontrollerinde Covid-19 tedbirlerine Yönelik İlave Gereklilikler

A. GENEL HİJYEN

1. Koronavirüs tedbirleri kapsamında işletmelerin faaliyet öncesi, mola sonrası ve faaliyet bitiminde temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerinin uygulanmalı, bu işlemler günlük olarak kaydedilmelidir.
2. Personeller arasındaki sosyal mesafenin korunacağı ve personelin mümkün olduğu kadar az kişi ile temas sağlayacağı bir çalışma düzenine geçilmeli, Koronavirüs tedbirleri kapsamında işletmelerin alanı sosyal mesafe (en az 2 metre) kuralına uygun olacak şekilde olmalı. Bulaşık alandan temiz alana mekanik hava akımı önlenmeli, %100 temiz havanın sirkülasyonu sağlanacak şekilde havalandırma sağlanmalı, havalandırma sisteminin filtrelerin temizliği, bakım-onarımı periyodik olarak yapılmalıdır.
3. Depo yeterli kapasitede olmalı, yeterli havalandırma sağlanmalı, gerekli durumlarda sıcaklıkların izlenmesini ve kayıt edilmesini sağlamalıdır. Havalandırma, Covid-19 Kapsamında Klima/Klimlendirme Sistemlerinde Alınacak Önlemlere uygun olmalıdır.
4. Drenaj sistemi, bulaşma riskini önleyecek şekilde oluşturulmalı, drenaj sistemleri çevreye zarar vermemeli, yeterli sayı ve boyutta drenaj kanalı bulunmalı, atık su kanalları zararlı girişine, koku yayılmasına ve atıkların kanaldan geri dönüşüne karşı güvenilir, temizlenebilir-dezenfekte edilebilir olmalıdır.
5. İşletmenin girişinde dezenfektanlı paspas ve her bölümünde yeterli sayıda lavabo ve el dezenfektanı bulundurulması, işletmede varsa banyolar ve tuvaletlerin Sodyum Hipoklorit ile düzenli olarak dezenfeksiyonu sağlanmalı, atık su borularında kaçak, çatlak, vb. tespit edilerek onarılmalı, kanalizasyon sistemi dışına yayılması engellenmelidir.
6. Lavabo girişlerine dezenfektan paspas, sıcak ve soğuk akan su, el temizleme ve dezenfeksiyon malzemeleri, tek kullanımlık kağıt havlu bulundurulmalıdır.
7. Gıda yıkama bölümleri, el yıkama bölümlerinden ayrı olmalıdır. Gıda yıkama bölümünde sıcak akan su ve yeterli sayıda ve büyüklükte yıkama havuzları bulundurulmalı, gıdaların yıkanmasında kullanılan su güvenilir olmalıdır.
9. Drenaj sistemi, ön arıtma işleminden sonra deşarj noktasından önce dezenfeksiyon işlemine tabi tutulmalı, su ve atık su yönetimleri oluşturulmalıdır.
10. Soyunma odalarında, yemekhanede, servislerde, sosyal mesafenin korunması için gerekli önlemleri alınması sağlanmalıdır.
11. Temizlik ve dezenfeksiyon maddeleri gıdanın bulunduğu alanlarda depolanmamalıdır.
12. İşletme İçi Salgın Tedbir Planı hazırlanmalıdır.

B. ÖZEL HİJYEN GEREKLİLİKLERİ

1. Corona virüsünün yüzeyde tutunma süreleri dikkate alınarak günlük temizlik-dezenfeksiyon işlemleri uygulanmalı ve kaydedilmelidir.
2. Tavan yüksekliği, çalışan alanın m²sine uygun havalandırma sağlamalıdır.

Yazışma adresi / Correspondence: Sibel Özçakmak, Mimar Sinan Mah. Belediye Cad. No:12 Kat:3 Atakum- Samsun
E-posta: sibel.ozcakmak@tarimorman.gov.tr

ORCID IDs of the author: '0000-0001-9426-0919

3. Kapılar temizlenebilir, dezenfeksiyona uygun, pürüzsüz ve emici olmayan malzemeden üretilmiş olmalı, günlük olarak temizlik-dezenfeksiyon işlemi yapılmalı ve kaydedilmelidir.
4. Tüm yüzeyler günlük olarak en geç 2 saatte 1 kez olmak üzere temizlik-dezenfeksiyon işlemi yapılmalı ve kaydedilmelidir.

Pazar yerleri ile ilgili gereklilikler

1. Mevcut pazar yerlerinde ve yoğunluğu dağıtmak için belirlenen yeni pazar/satış yerlerinde her bir satış yeri (tezgah/sergi) arasında en az 3 metre mesafe olacak şekilde pazar/satış yerlerinin düzenlenmesi, pazar/satış yerlerinde ambalajsız satılan yaş sebze ve meyvelerin tüketicilerce temas edilmeden, doğrudan pazarcı esnafı tarafından hijyen koşullarına dikkat edilerek poşetlenmesi/satışı yapılmalıdır.
2. Bu yerlerde çöp toplama (gıda ve tıbbi atık), hijyen ve dezenfeksiyon hususunda gerekli tedbirler alınmalıdır.
3. Kişisel hijyen kurallarına uyması konusunda gerekli koruyucu önlemlerin alınması (maske, eldiven, bone vb.), el dezenfektanı bulundurulmalıdır.

C. TAŞIMA

1. Taşımada kullanılan araçların özellikle fazla temas edilen yüzeyler başta olmak üzere sık aralıklarla (en geç iki saatte bir) temizlik-dezenfeksiyonu sağlanmalıdır.

D. EKİPMAN İLE İLGİLİ GEREKLİLİKLER

1. Kullanılan dezenfektan maddenin uygulanacak yüzeye spesifik olması, korozif etki göstermemesi ve etki spektrumunun tüm mikroorganizmaları kapsayacak şekilde (bakteri, maya-küf, virüs vb.) olması sağlanmalıdır.
2. Temizliği yapan kişi yaptığı işlemin kaydını tutmalı, uygulama sırasında maske ve diğer koruyucu tedbirler sağlanmalıdır.

E. TIBBİ ATIK YÖNETİMİ

Covid-19 pandemisine yönelik atık yönetim (tıbbi, evsel, diğerleri) sistemi oluşturulmalı, maske-eldiven-diğer koruyucu ekipmanları içeren kontamine olmuş atıklar üzerleri örtülebilen kaplar içinde toplanmalı, 500 mg/L olan klor içeren bir dezenfektan ile muameleden sonra, ağız kapalı bir poşet içinde tehlikeli çöplere atılmalıdır.

F. SU TEDARİKİ

1. Merkezi su arıtma yöntemleri tüm bulaşıcı hastalık etmenlerini inaktive edecek şekilde kurulmalı, işletmede su güvenliği sağlanmalıdır.

G. PERSONEL HİJYENİ

1. Solunum yolu enfeksiyonu bulguları gösteren kişilerin bireysel izolasyonu sağlanmalı, son 14 gün içinde Koronavirüs teşhisi konmuş herhangi biriyle temas ettiyse bunu gıda işletmesine bildirmeli, gıda işletmesine gitmeyip kendisine ev karantinası uygulanmalıdır.
2. Bütün personel ağız ve burnu kapatacak şekilde tıbbi maske kullanılmalı, ortak kullanım alanlarında maskeye temastan sonra el hijyeni sağlanmalıdır.
3. Olası bir bulaş ortaya çıkması ya da şüphesi halinde iletişim ve acil durum senaryosu hazırlanmalıdır. İşletmede "Acil durumda ulaşılabilecekler listesi ve iletişim bilgileri" güncel tutulmalıdır.
4. Gıda işletmesine giren herkesin, basit bir formla sağlık/seyahat anket kaydı tutulmalı ve dijital termometre ile ateşi ölçülmelidir.
5. Soyunma odalarında, yemekhanede, servislerde, sosyal mesafenin korunması için gerekli önlemler alınmalıdır.
6. İşletmenin girişinde ve her bölümde yeterli sayıda el dezenfektanı bulundurulmalıdır.
7. Personelin kullandığı kirlenmiş maske-eldiven vb için uygun tıbbi atık prosedürü uygulanmalıdır.
8. Gıda ile temas halinde çalışan tüm personelin herhangi bir bulaşıcı hastalık taşımadığına dair sağlık raporu beyan edilmeli, düzenli sağlık kontrolü yapılmalıdır. Bulaşıcı hastalık açısından izlenebilmesi için personelden periyodik bilgi (HES kodu gibi) alınmalıdır.
9. İşletmenin Salgın Yönetiminden sorumlu personel bulundurulmalıdır.
10. Gıda ile taşınabilen bir hastalığı olan veya bu hastalığın taşıyıcısı durumundaki personelin, gıda ile temas etmesine veya gıdaların işlendiği alanlara girmesine izin verilmemelidir.
11. İşletmede temizlik ve personel hijyeninden sorumlu kişi veya kişiler bulunmalıdır.
12. Bulaşıcı hastalıklarla mücadele döneminde aynı vardiyada aynı personel çalıştırılmamalıdır.

H. GIDALARIN AMBALAJLANMASINA VE PAKETLENMESİNE İLİŞKİN HÜKÜMLER

1. Yeni tip koronavirüsün yüzeylerde tutunması süreleri (3 saat ile 5 gün arası) ambalajlama ve paketlemede kullanılan materyalin bulaşma kaynağı olmaması için gerekli tedbirler alınmalıdır. Depo ortamı sık sık havalandırılmalıdır.
2. Ambalaj materyali, bulaşma riskine maruz kalmayacak biçimde korunaklı halde depolanmalı, çapraz bulaşmalara karşı önleyici tedbirler alınmalıdır.

I. EĞİTİM

1. Gıda işinde çalışan personelin yaptıkları işin gerektirdiği gıda hijyeni ve *Bulaşıcı Hastalıklarla Mücadele* konularında belirli aralıklarda bilgilendirme ve eğitimleri sağlanmalı, mutlaka bir "Kriz Yönetimi Ekibi" oluşturulmalı, bu ekip tarafından süreçte gerekli olacak kişisel koruyucu ekipman ve hijyenik malzeme miktarı ve stok düzenli olarak gözden geçirilmelidir.
2. Çalışanların bilinçlenmesi, kuralların uygulanması ve çalışma ortamının iyileştirilmesi için gıda hijyeni ve pandemiye ilişkin afiş ve broşürler bulundurulmalıdır.
3. Gıda işletmesinde çalışan personelin "Gıda Hijyeni" konusunda Eğitim Sertifikası bulunmalıdır.

Referanslar

Anonim. (2010) Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu, Kanun No: 5996, Kabul No: 11/06/2010. Resmi Gazete Sayısı: 27610. Erişim adresi: <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/06/20100613-12.html>, Erişim Tarihi: 26.09.2017.

Anonim. (2011) Gıda Hijyen Yönetmeliği. Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111217-5.htm>, Erişim Tarihi: 15.02.2013.

Anonim. (2020) Covid-19 Salgın yönetimi ve çalışma rehberi. Bilimsel Danışma Kurulu çalışması. Erişim adresi: <https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/38700/0/Covid19salginyonetimivecalismarehberipdf.pdf>, Erişim Tarihi: 01.08.2020.