

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

*Harran University  
Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*



*Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınıdır  
Published by Harran University Faculty of Veterinary Medicine*

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Harran University  
Journal of The Faculty of Veterinary Medicine

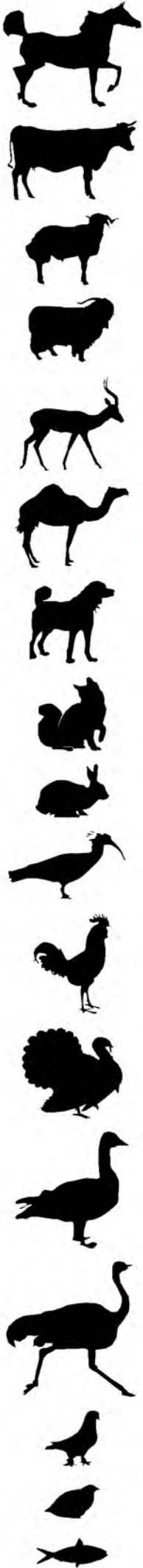


Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınıdır  
Published by Harran University Faculty Of Veterinary Medicine

YIL/YEAR:2021

CİLT/VOLUME:10

SAYI/ISSUE: 2



# HARRAN ÜNİVERSİTESİ

## VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Harran University  
Journal of the Faculty of Veterinary Medicine

**Harran Üniversitesi**  
**Veteriner Fakültesi Adına**  
**Sahibi/Owner**  
Prof. Dr. Nihat DENEK  
**Dekan/Dean**

**Baş Editör/Editor in Chief**  
Prof. Dr. Oktay KESKİN

**Editörler Kurulu/Editorial board**  
Prof. Dr. Füsün TEMAMOĞULLARI  
Prof. Dr. Şükrü GÜRLER  
Doç. Dr. Rahşan YILMAZ  
Doç. Dr. Deniz KORKMAZ  
Doç. Dr. Serap KILIÇ ALTUN  
Doç. Dr. Birten EMRE

**İngilizce Editörü/English Editor**  
Prof. Dr. Ayşe Menteş GÜRLER

**Mizanpaj Editörü/Layout Editor**  
Dr. Öğr. Üyesi İrfan ÖZGÜNLÜK

**Dergi Sekreteri/Journal Secretary**  
Arş. Gör. Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE

**Yazışma /Correspondence**  
Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi  
Editörlüğü Eyyübiye Kampüsü, 63200 -  
Şanlıurfa/TÜRKİYE  
**Tel: +90 414 318 38 59**  
**+90 414 318 38 55**  
**Faks: +90 414 318 39 22**  
**e-mail: harranvet@gmail.com**

*Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi Hakemli Bir Dergi Olup, Yılda 2(iki) Sayı Olarak Yayınlanır. ULAKBİM (Yaşam Bilimleri Veri Tabanı), Türkiye Atıf Dizini, Cab abstracts, Index Copernicus, Zoological Record, SOBIAD gibi ulusal ve uluslararası indeksler tarafından taranmaktadır.*

Yıl/Year: 2021- Cilt/Volume: 10 Sayı/Issue 2

### Danışma Kurulu/Advisory Board

Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Ali Reha AĞAOĞLU, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniv. Vet. Fak. Burdur, Türkiye.  
Prof. Dr. Alkan KAMILOĞLU, Kafkas Üniv. Vet. Fak. Kars, Türkiye.  
Prof. Dr. Anila HODA, Agric. Uni. of Tirana, Fac. of Agric.& Environ. Tirana, Albania.  
Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK, Selçuk Üniv. Vet. Fak. Konya, Türkiye.  
Prof. Dr. Bülent ULUTAŞ, Aydın Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak. Aydın, Türkiye.  
Prof. Dr. Ender YARSAN, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Ergun AKÇAY, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Gerald REINER, Justus-Liebig Uni. Fac. of Vet. Med. Giessen, Germany.  
Prof. Dr. Gülay ÇİFTÇİ, Ondokuz Mayıs Üniv. Vet. Fak. Samsun, Türkiye.  
Prof. Dr. Halil Selçuk BİRİCİK, Afyon Kocatepe Üniv. Vet. Fak. Afyonkarahisar, Türkiye.  
Prof. Dr. Hasan EREN, Aydın Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak. Aydın, Türkiye.  
Prof. Dr. Kazım ŞAHİN, Fırat Üniv. Vet. Fak. Elazığ, Türkiye.  
Prof. Dr. Manzoor Ur Rahman MIR, SKUAST Kashmir Fac. of Vet. Sci. & Anim. Husbandry. Kashmir, India.  
Prof. Dr. Mehmet Emin TEKİN, Selçuk Üniv. Vet. Fak. Konya, Türkiye.  
Prof. Dr. Muammer GÖNCÜOĞLU, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Murat YILDIRIM, Kırıkkale Üniv. Vet. Fak. Kırıkkale, Türkiye.  
Prof. Dr. Narin LİMAN, Erciyes Üniv. Vet. Fak. Kayseri, Türkiye.  
Prof. Dr. Osman KUTSAL, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Rahşan ÖZEN, Fırat Üniv. Vet. Fak. Elazığ, Türkiye.  
Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Doç. Dr. İlknur PİR YAĞCI, Kırıkkale Üniv. Vet. Fak. Kırıkkale, Türkiye.  
Prof. Assoc. Dr. Sokol DURO, Agricultural University of Tirana. Fac. of Vet. Med. Tirana, Albania.  
Dr. Kushvar Mammadova, Azerbaijan State Agricultural Univ, Fac. of Vet. Med. Gence Azerbaycan.  
Dr. Tomasz Szara, Institute of Veterinary Medicine. Warsaw, Poland.

**Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**  
**2021 Yılı 10. Cilt 2. Sayı Hakem Listesi (alfabetik sıra)**  
**The Referees List of This Issue (in alphabetical order)**

Prof. Dr. Ahmet Kürşat AZKUR	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Alkan KAMILOĞLU	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ayşe MENTEŞ GÜRLER	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Bestami YILMAZ	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Ergun AKÇAY	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Faruk BOZKAYA	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Hikmet YETER ÇOĞUN	Çukurova Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. İbrahim DEMİRKAN	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. İsmail Hakkı EKİN	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Kadir YEŞİLBAĞ	Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Mehmet İRIADAM	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Mehmet Kenan TÜRKYILMAZ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Mehmet Osman ATLI	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Murat BOYACIOĞLU	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Necmettin ÜNAL	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Nurhan ERTAŞ ONMAZ	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Pınar AYVAZOĞLU DEMİR	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Recep ASLAN	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Soner ALTUN	Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ	Aydın Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Tahir KARAŞAHİN	Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Veysel Soydal ATASEVEN	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Prof. Dr. Zehra BOZKURT	Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU	Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Ali YİĞİT	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Aydın ÇEVİK	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Dilek AKŞİT	Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Evrim DERELİ FİDAN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Hakan ÜSTÜNER	Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Handan Hilal ARSLAN YAVUZ	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. İbrahim KÜÇÜKASLAN	Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. İlknur PİR YAĞCI	Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Kıvanç İRAK	Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Korhan ARSLAN	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Mustafa KÖM	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Mustafa TÜRE	TC Tarım ve Orman Bakanlığı Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü
Doç. Dr. Nurgül ATMACA	Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Ömer KORKMAZ	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Seçil ABAY	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Semra GÜRBÜZ	Mardin Artuklu Üniversitesi Turizm Fakültesi
Doç. Dr. Sevda PEHLİVANLAR ÖNEN	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Veli GÜLYAZ	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Yasin BAYKALIR	Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doç. Dr. Yasin DEMİRASLAN	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Afşin KÖKER	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Ali GÜLAYDIN	Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Aydın DAŞ	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Esra CANOĞLU	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Evren ESİN	Çukurova Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Funda EŞKİ	Çukurova Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Ozan TEKELİ	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi İrfan ÖZGÜNLÜK	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dr. Öğr. Üyesi Gülseren KIRBAŞ DOĞAN	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Öğr. Gör. Dr. Orkun BABACAN	Balıkesir Üniversitesi Kepsut Meslek Yüksekokulu



**İçindekiler / Contents**

**Araştırma Makaleleri / Research Articles**

**Sayfa /Page**

1. Van'da Tüketime Sunulan Çiğ Sütlerin Fizikokimyasal Özellikleri  
Physicochemical Properties of Raw Cow's Milk Offered for Consumption in Van  
**Rabia Mehtap TUNCA, Özgür İŞLEYİCİ, Yakup Can SANCAK, Tuncer ÇAKMAK** **87-93**
2. The Effect of Swimming Training on Adrenomedullin mRNA Levels in the Aorta, Kidney, and Adrenal Gland of L-NAME-induced Hypertensive Rats  
L-NAME İndüksiyonu ile Oluşturulan Hipertansiyon Modelinde Yüzme Egzersizinin Aorta, Böbrek ve Adrenal Bez Adrenomedüllin mRNA Düzeylerine Etkisi  
**Ece KOC YILDIRIM, Esra ORENLİLİ YAYLAGUL, Mehmet KAYA, Muharrem BALKAYA, Celal ULGER, Ferda BELGE, Hümeysa UNSAL, Cengiz UNSAL, Mehmet EKICI, Zahide DEDEOGLU, Ilkem CEYLAN, Aykut Gokturk UNER** **94-99**
3. Aydın İli Söke İlçesinde Sütçü İneklerde Subklinik Mastitis Prevalansının ve Mastitise Neden Olan Aerobik Bakterilerin Belirlenmesi  
Determination of Subclinical Mastitis Prevalence and Aerobic Bacteria Causing Mastitis in Dairy Cows in Soke District of Aydın  
**Özkan ÇELİK, Erdem SUR, Hayrettin ÇETİN** **100-106**
4. Yüksek Çevre Sıcaklığında Yetiştirilen Etlik Piliçlerde İçme Suyu Sıcaklığının ve Yerleşim Sıklığının Bazı Refah Parametreleri Üzerine Etkisi  
The Effect of Drinking Water Temperature and Stocking Density on Some Welfare Parameters of Broilers Reared at High Ambient Temperature  
**Mehmet KAYA, Evrim DERELİ FİDAN** **107-113**
5. An Evaluation of Silage Widely Use in Animal Feeding in Terms of Legislation in Turkey and European Union  
Hayvan Beslemede Yaygın Olarak Kullanılan Silaj Yeminin Avrupa Birliği ve Türkiye'de Mevzuat Açısından Değerlendirilmesi  
**Gökhan ASLIM, Emine Merve DANIŞ** **114-119**
6. Effects of IPARD Programme on Animal Husbandry in Aydın  
IPARD Programının Aydın İli Hayvancılığı Üzerine Etkileri  
**M. Kenan TÜRKYILMAZ** **120-125**
7. Isolation of Methicillin Resistant (MR) Staphylococci from Chicken Meat Samples  
Tavuk Eti Örneklerinden Metisiline Dirençli (MR) Stafilokok İzolasyonu  
**Özkan ASLANTAŞ, Nejla YILDIRIM** **126-131**
8. Diatomitin Kilis Keçilerinin Kan Selenyum ve Çinko Değerleri ile Canlı Ağırlık Değişimlerine Etkileri  
The Effects of Diatomite on Blood Selenium and Zinc Values and The Live Weight Changes in Kilis Goats  
**Mehmet Şevki ÇADIRCI, Mehmet İRİADAM** **132-138**
9. Tildipirosinin Sığır Trakea Epitel Hücreleri Üzerinde Yara İyileştirici Etkisi  
Wound Healing Effect of Tildipirosin on Bovine Tracheal Epithelial Cell  
**Yaşar ŞAHİN, Ebru YILDIRIM, Hüsamettin EKİCİ, Mustafa TÜRK, Esra ARAT** **139-143**
10. Mastitisli Sığırlardan İzole Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Virülens Gen Profillerinin Belirlenmesi  
Determination of Virulence Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolated from Cattle with Mastitis  
**Ayşe Rümeyya NALÇA, Timur GÜLHAN** **144-152**

11. An Analysis on Migratory Beekeeping in Inner-West Anatolia Region, Afyonkarahisar, Turkey: Production, Practice, Marketing, and Challenges  
İç-Batı Anadolu Bölgesi, Afyonkarahisar, Türkiye'de Göçmen Arıcılık Üzerine Bir Analiz: Üretim, Uygulamalar, Pazarlama ve Zorluklar  
**Ahmet AKPINAR, Zehra BOZKURT** 153-160
12. Comparison of Anesthetic Efficacy of Intranasal Administration of Medetomidine / Ketamine and Diazepam / Ketamine Combinations on New Zealand White Rabbits  
Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarında Medetomidin / Ketamin ve Diazepam / Ketamin Kombinasyonlarının İntranazal Uygulamasının Anestezik Etkinliğinin Karşılaştırılması  
**Zeynep BOZKAN, Rahime YAYGINGUL, Osman BULUT** 161-167
13. *PKHD1* Geni Yanlış Anlam Mutasyonları Kedilerde Sebebi Bilinmeyen Böbrek Hastalıkları İçin Önemli Olabilir mi?  
Could *PKHD1* Gene Missense Mutations Be Important for Idiopathic Kidney Disease in Cats?  
**Nüket BİLGİN** 168-171
14. Carcass Characteristics and Physical Meat Quality Properties of Spent Broiler Breeder Hens and Commercial Spent Layer Hens  
Damızlık ve Ticari Yumurtacı Tavuklarda Karkas Özellikleri ve Et Kalitesi  
**Metin PETEK, Enver ÇAVUŞOĞLU** 172-177
15. Calculation of The Intracranial Volume in Gazelles (*Gazella subgutturosa*) by Stereology and Computed Tomography  
Ceylanlarda (*Gazella subgutturosa*) Intracranial Hacmin Stereoloji ve Bilgisayarlı Tomografi ile Hesaplanması  
**İsmail DEMİRCİOĞLU, Ali KOÇYİĞİT, Sedat AYDOĞDU, Nazan GEZER İNCE, Bestami YILMAZ** 178-183
16. Treatment of Cat Distal Diaphyseal and Supracondylar Femur Fractures with Dynamic Intramedullary Cross Pinning Technique  
Kedilerin distal diyafizer ve suprakonduler femur kırıklarının dinamik intramedüller çapraz pin tekniği ile tedavisi  
**Metehan Turan CEBECİ, Birkan KARSLI** 184-190
17. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR Method in Fish and Water Samples from Tigris River, Turkey  
Dicle Nehrindeki Balık ve Su Örneklerinde *Vibrio parahaemolyticus*'un PCR Yöntemi ile İdentifikasyonu  
**Filiz ÖZCAN, Neval Berrin ARSERİM, Muzaffer Aydın KETANİ** 191-195
- Olgu Sunumu/Case Report**
18. Surgical Management of Abortion in a Rat  
Bir Siçanda Abortusun Cerrahi Yönetimi  
**Serdal KURT, Seçkin SALAR** 196-198
19. Bir Bağdat Güvercininde Dev Hücreli Osteosarkom Olgusu: Türkiye'de İlk Kayıt  
The Case of Giant Cell Osteosarcoma in a Baghdad Pigeon: First Record in Turkey  
**Ünal YAVUZ, Ali HAYAT, Kerem YENER, Nihat YUMUŞAK** 199-202
- Derleme/Review**
20. Veteriner Hekimlikte OTC İlaçlar  
OTC Drugs in Veterinary Medicine  
**Erdem GÜLERSOY, Canberk BALIKÇI, Mutlu SEVİNÇ** 203-210

## Van'da Tüketime Sunulan Çiğ Sütlerin Fizikokimyasal Özellikleri

Rabia Mehtap TUNCAY<sup>1,a,\*</sup>, Özgür İŞLEYİCİ<sup>1,b</sup>, Yakup Can SANCAK<sup>1,c</sup>, Tuncer ÇAKMAK<sup>1,d</sup>

<sup>1</sup>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Van, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-3510-5369, <sup>b</sup>ORCID:0000-0001-6319-3880, <sup>c</sup>ORCID:0000-0003-4490-9606,

<sup>d</sup>ORCID: 0000-0002-9236-8958

Geliş Tarihi: 09.07.2021

Kabul Tarihi: 25.10.2021

**Özet:** Bu araştırma, Van il merkezinde tüketime sunulan çiğ inek sütlerinin fizikokimyasal kalitesini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla bakkal, market ve süpermarketlerden alınan toplam 60 adet çiğ inek sütü örneğinin yoğunluk, pH, titrasyon asitliği, yağ, kuru madde, yağsız kuru madde, kül ve protein miktarları ile değerleri incelenmiş ve örneklerdeki bulgular sırasıyla ortalama  $1.030 \pm 0.003$  g/ml,  $6.59 \pm 0.44$ ,  $0.23 \pm 0.23$  LA,  $3.73 \pm 0.74$ ,  $12.95 \pm 1.72$ ,  $9.22 \pm 1.46$ ,  $0.68 \pm 0.16$  ve  $3.59 \pm 0.41$  olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak; bu çalışmada incelenen çiğ inek sütü örneklerinin 14'ü (%23.33) yoğunluk, 29'u (%48.33) titrasyon asitliği, 23'ü (%38.33) yağ, 19'u (%31.67) yağsız kuru madde yönünden Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'nde belirtilen standarda uymadığı belirlenmiştir. Çiğ inek sütlerinin fizikokimyasal kalitesinin iyileştirilmesi için denetimlerin düzenli ve sık aralıklarla yapılması, kontrol ve izleme programlarının etkin bir şekilde uygulanması, ayrıca üretici ve tüketicilerin çiğ sütler hakkında bilinçlendirilmeleri gerekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Çiğ inek sütü, Fizikokimyasal özellikler, Van.

### Physicochemical Properties of Raw Cow's Milk Offered for Consumption in Van

**Abstract:** This research was carried out to determine the physicochemical quality of raw cow milk offered for consumption in the city center of Van. For this purpose, the density, pH, titration acidity, fat, dry matter, fat-free dry matter, ash, and protein amounts, and values of a total of 60 raw cow milk samples taken from grocery stores, markets, and supermarkets were examined. The results in the samples were averaged  $1.030 \pm 0.003$  g/ml,  $6.59 \pm 0.44$ ,  $0.23 \pm 0.23$  LA,  $3.73 \pm 0.74$ ,  $12.95 \pm 1.72$ ,  $9.22 \pm 1.46$ ,  $0.68 \pm 0.16$  and  $3.59 \pm 0.41$  respectively. It was determined that 14 (23.33%) density, 29 (48.33%) titration acidity, 23 (31.67%) fat, 19 (31.67%) non-fat dry matter of the raw cow milk samples did not comply with the standards specified in the Turkish Food Codex Raw Milk and Heat Treated Drinking Milks Communiqué. In order to improve the physicochemical quality of raw cow milk, regular and frequent inspections, effective control and monitoring programs, and raising awareness of producers and consumers about raw milk are required.

**Keywords:** Physicochemical properties, Raw cow's milk, Van.

### Giriş

İnsanların sağlıklı bir yaşam sürdürebilmeleri günlük hayatta beslenmeye verdikleri önemle mümkün olabilmektedir. Tahıl, sebze, meyve, et ve et ürünleri ile süt ve süt ürünlerinin her gün düzenli bir şekilde tüketilmesi yeterli ve dengeli beslenmenin en önemli şartıdır (USDA, 1992). Hayvansal kökenli gıda maddelerinden olan süt ve süt ürünleri de bu gıdalar arasındaki en önemli bölümü oluşturmaktadır (Kaya, 2014).

İçerdiği hayvansal kaynaklı protein, yağ, laktoz, vitamin ve mineral maddeler yönünden zengin bir bileşime sahip olan süt ve süt ürünlerinin beslenmede önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Günlük diyetlerde yer alan bu ürünlerin hipertansiyon ve kolon kanseri riskini azalttığı, özellikle de yaşlılarda kalsiyum eksikliğine bağlı osteoporoz oluşumunu engellediği ifade edilmektedir (Anonymous, 1997; Chandan ve Shah, 2006; Davoodi ve ark., 2013).

Beyaz, hafif tatlı ve kendine has bir kokusu olan süt, doğumdan sonra memelilerin meme bezleri tarafından salgılanır ve yavrunun hayatını sürdürmesi için gerekli olan tüm besin unsurlarını içerir (Belitz ve ark., 2009). Sütün kimyasal bileşimi elde edildiği hayvanın türü, ırkı, laktasyon dönemi ve beslenme durumuna bağlı olarak farklılık gösterebilmekte, ayrıca bu farklılığın oluşmasında genetik ve çevresel şartlarında etkisi olabilmektedir (Metin, 2005). Hile ve taşış amacıyla sütün yağının alınması veya süte su, farklı gıda katkı maddeleri ve kimyasalların katılması sonucunda sütün kalite özellikleri değişerek besleyici değeri azalmaktadır (Tekinşen, 2000; Kurt ve ark., 2012).

Bu araştırma, Van il merkezinde bakkal, market ve süpermarketlerde tüketime sunulan çiğ inek sütlerinin fizikokimyasal kalitesini belirlemek ve bu sütlerin Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'ne (TGK, 2019)

uygunluğunu ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

## Materyal ve Metot

Çalışmada materyal olarak satışa sunulan çiğ inek sütü kullanıldığı için Etik Kurul İzin Belgesine gerek yoktur.

Bu çalışmada; 2018 yılı Ocak-Mart aylarında Van il merkezinde bulunan 20 farklı bakkal, market ve süpermarkette tüketime sunulan toplam 60 adet çiğ inek sütü örneği kullanılmıştır. Satış yerlerinden aseptik koşullarda ve en az 500 ml olacak şekilde steril cam kavanozlara alınan örnekler +4 °C'de soğuk zincirde laboratuvara getirilerek en kısa sürede analizlere alınmıştır.

Çiğ süt örneklerinin % kuru madde oranı105 °C'ye ayarlanmış etüvde (Nüve, EN550, Türkiye), % yağ oranı gerber santrifüjünde (Gerber Instruments,

İsviçre), yağsız kuru madde oranı örneklerde belirlenen % kuru madde oranı yağ miktarının çıkarılmasıyla, % protein oranı kjeldahl cihazında (KJELDATHERM®, Gerhardt, Almanya) ve % kül oranı kül fırınında (Thermo Scientific, K114, Amerika), yoğunluk değeri sütün sıcaklığı 20 °C olacak şekilde laktodansimetrede, pH değeri pH-metrede (Hanna® pH 890) ve titrasyon asitliği oranı fenolftalein renk indikatörü eşliğinde % Laktik asit cinsinden titrasyon yöntemine göre belirlenmiştir (Tekinşen ve ark., 1997; Kurt ve ark. 2012).

## Bulgular

İncelenen çiğ inek sütü örneklerinde belirlenen fizikokimyasal analiz bulguları Tablo 1'de ve örneklerde belirlenen bulgular arasındaki korelasyonlar Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Süt örneklerinde belirlenen fiziko-kimyasal analiz sonuçları.

	Yoğunluk	pH	Asidite LA%	Yağ	KM	YağsızKM	Rutubet	Kül	Protein
<b>Örnek Sayısı</b>	60	60	60	60	60	60	60	60	60
<b>Min.</b>	1.022	5.33	0.11	2.60	10.45	6.65	81.60	0.43	2.85
<b>Mak.</b>	1.036	7.26	1.99	5.69	18.40	14.10	89.55	0.99	4.48
<b>Ort.</b>	1.030	6.59	0.23	3.73	12.95	9.22	87.05	0.68	3.59
<b>S. Hata</b>	0.0004	0.06	0.03	0.10	0.22	0.19	0.22	0.02	0.05
<b>S. Sapma</b>	0.003	0.44	0.23	0.74	1.72	1.46	1.72	0.16	0.41

LA(%): Laktik Asit cinsinden asidite.

**Tablo 2.** Kimyasal analiz sonuçlarının ortalaması ve sıklık dağılım düzeyleri (n=60).

	Yoğunluk	pH	LA (%)	Yağ	KM	YagsızKM	Rutubet	Kül	Protein
Yoğunluk	1								
pH	,155	1							
LA(%)	,067	,045	1						
Yağ	-,069	-,075	-,130	1					
KM	-,091	-,079	-,110	,539*	1				
Yağsız KM	-,072	-,055	-,064	,131	,905*	1			
Rutubet	,091	,079	,110	-,539*	-1,000*	-,905*	1		
Kül	-,017	,107	-,106	,129	,036	-,023	-,036	1	
Protein	,197	-,094	-,082	,081	,368*	,393*	-,368*	-,180	1

\*Korrelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır, LA (%): Laktik Asit cinsinden asidite.



## Tartışma ve Sonuç

Çiğ inek sütünün fizikokimyasal bileşimi genellikle ürünün kalite özellikleri, saklama koşulları ve raf ömrünün belirlenmesinde önemlidir (Nwankvwa ve ark., 2015).

Sütlerdeki yoğunluk; sağım hayvanının cinsi ve türü, sağım zamanı ve sıklığı ile hayvanların beslenmesinde kullanılan yemlerin bileşimine bağlı olarak değişebilmektedir (Walstra ve ark., 2006). Ayrıca, hile ve tağşiş amaçlı sütün yağının alınması veya süte su katılması durumlarında da yoğunluk değerleri yapılan uygulamaya göre düşebilmekte veya artabilmektedir (Akin ve ark., 2016; Demirci ve ark., 2010).

İncelenen çiğ inek sütü örneklerinde ortalama yoğunluk değeri  $1.030 \pm 0.003$  g/ml olarak belirlenmiştir. Örneklerde tespit edilen ortalama yoğunluk değeri 20 °C'deki sütlerde yoğunluğun  $1.025-1.039$  g/ml arasında belirlenebileceğini belirten araştırmacının (Belitz ve ark., 2009; Metin, 2005) ifadeleriyle uyumludur. Örneklerde tespit edilen ortalama yoğunluk değeri Özrenk ve Bayar (2008), Aydın ve ark. (2010), Gemechu ve ark. (2015) ile Akin ve ark. (2016) tarafından çiğ inek sütlerinde bildirdikleri değerlere benzer, ancak bu araştırmada belirlenen ortalama yoğunluk değeri Türkoğlu ve ark. (2003) ile Göncü ve ark. (2017) tarafından çiğ inek sütlerinde bildirdikleri değerlerden düşük, Beykaya ve ark.'nın (2017) bildirdiği değerden ise yüksektir. Tesfay ve ark. (2015) tarafından yapılan araştırmada, çiftliklerden ve süt toplayıcılarından alınan çiğ inek sütü örneklerinde belirlenen yoğunluk değerlerinin farklı olduğu ifade edilmiştir. Bu araştırmada belirlenen ortalama yoğunluk değeri Tesfay ve ark.'nın (2015) çiftliklerden aldıkları çiğ inek sütlerinde belirledikleri yoğunluk değeri ile benzer, süt toplayıcılarından aldıkları çiğ inek sütlerinde belirledikleri değerden ise yüksektir. Bu araştırmanın bulguları ile diğer çalışmalarda bildirilen değerler arasındaki farklılıklar, incelenen süt örneklerinin alındığı çiftlik ve marketlerin farklı olmasına, hile ve tağşiş amaçlı uygulamalara bağlanabilir.

Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'nde (TGK, 2019) sütün yoğunluğunun en az 1.028 g/ml olması gerektiği ifade edilmektedir. Bu araştırmada incelenen çiğ inek sütü örneklerinin 14 (%23.33)'ünün ilgili standarda uygun olmadığı belirlenmiştir.

Sütlerdeki pH değeri, asitliğin gelişebileceği bütün şüpheli durumlarda belirlenmesi gereken önemli bir parametredir. Ayrıca, sütün pH değeri pıhtılaşma, enzim aktivitesi, mikrofloranın gelişimi ve renk reaksiyonları üzerine de doğrudan etkili olduğundan ürünün kalitesi ve randımanı hakkında önemli bilgilerin elde edilmesine olanak

sağlamaktadır. (Tekinşen ve ark., 1997; Tekinşen ve ark., 2002; Walstra ve ark., 2006). Bu araştırmada incelenen çiğ inek sütü örneklerinde belirlenen ortalama pH değeri ( $6.59 \pm 0.44$ ) Özrenk ve Bayar (2008), Kesenkaş ve Akbulut (2010), Diler ve Baran (2014), Belbachir ve ark. (2014), Akin ve ark. (2016) ile Göncü ve ark. (2017) tarafından bildirilen değerlere benzer, Aydın ve ark. (2010), Gemechu ve ark. (2015), Tankoano ve ark. (2016), Beykaya ve ark. (2017) ile Tuncer ve ark. (2017) tarafından bildirilen değerlerden ise yüksektir. Araştırmalar arasındaki farklılıklar, inek sütlerinin sağım zamanı ile sağım anındaki çevresel şartlardan, sağım yapılan mevsim farklılıklarından kaynaklanmış olabilir.

Yeni sağılmış olan taze sütler yapılarındaki fosfat, sitrat, karbondioksit, kazein, albümin ve globulin gibi serum proteinlerinden dolayı hafif asidiktir (Gandhi ve ark., 2020; Spreer, 1998). Sütün muhafazası sırasında ortamda bulunan mikroorganizmalar da laktozu parçalayarak laktik aside dönüştürür ve böylece asitlik artarak süt pıhtılaşır (Hutkins, 2019; Tekinşen ve ark., 1997). Tekinşen ve ark. (1997) sütün titre edilebilir asitlik değerinin %0.16-0.18 LA arasında olması gerektiğini ifade ederlerken, Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'nde (TGK, 2019) inek sütünün asitlik değerinin %0.135-0.20 LA arasında olması gerektiği belirtilmiştir. Sütte titre edilebilir asitlik değerinin %0.20 LA'nın üzerinde olması sütlerdeki mikroorganizma yükünün fazla olduğunu gösterirken, bu değer çok düşük olması ise hayvanlarda genellikle meme hastalıklarının olduğuna işaret etmektedir (Metin 2005; Mudgil ve Mudgil, 2017). İncelenen çiğ inek sütü örneklerinde ortalama titrasyon asitliği değeri  $0.23 \pm 0.23$  LA olarak belirlenmiş ve bu değer Gemechu (2016) ile Tankoano ve ark.'nın (2016) bildirdikleri değerlerden düşük, bazı araştırmacıların (Akin ve ark., 2016; Aydın ve ark., 2010; Gemechu ve ark., 2015; Hossain ve ark., 2011; Tesfay ve ark., 2015; Tuncer ve ark., 2017; Türkoğlu ve ark., 2003) bildirdikleri değerlerden ise yüksek olduğu görülmüştür. Bazı araştırmalarda çiğ inek sütlerinde bildirilen titrasyon asitliği değerleri ile bu araştırmada belirlenen değerler arasındaki farklılıklar sağım alanlarındaki çevresel faktörlerden, personel hijyeninden, sağım yapılan kaplar ve memelerin temizlik durumları ile işletmelerdeki süt soğutma sistemlerinin işlevlerinden kaynaklanmış olabilir. Nitekim Gemechu (2016) bu konularda yapılacak ihmal ve yanlış uygulamaların çiğ sütlerin titrasyon asitliği değerlerini önemli ölçüde etkilediğini ifade etmiştir. İncelenen bazı örneklerde titrasyon asitliği değerlerinin yüksek olmasında da uygun şartlarda muhafaza edilmeyen çiğ inek sütü örneklerinde üreyen mikroorganizmaların etkili olabileceği düşünülmektedir.

İncelenen çiğ inek sütü örneklerinin 31'inin (%51.66) ilgili standartta belirtilen (TGK, 2019) limit değerler arasında olduğu belirlenmiştir. Bazı örneklerde titrasyon asitliğinin limit değerlerin üzerinde olması incelenen çiğ inek sütlerindeki mikroorganizma faaliyetlerine, düşük olması ise sağımı yapılan hayvanlardaki meme hastalıkları veya süte nötralize edici maddelerin katılmış olmasına bağlanabilir.

Sütün önemli kalite unsurlarından olan ve fiyatlandırmada dikkate alınan süt yağı hile yapılmaya en çok maruz kalan süt bileşenlerindedir (Chavan ve Goyal, 2018; Karoui and De Baerdemaeker, 2007; Mansour ve ark., 2012; Tekinşen ve ark., 1997). Süt serumuna gevşek bir şekilde bağlı olan süt yağının özgül ağırlığı diğer bileşenlere göre daha düşük olduğundan süt yağı süttten kolayca ayrışabilmektedir (Alçıçek, 1995; Campbell ve Marshall, 2016; Metin, 1998; Şekerden ve Öztürk, 1995). Süt hayvanının ırkı, laktasyon periyodu, bireysel farklılıklar ve beslenmede kullanılan yem bileşimi sütün yağ oranını önemli düzeyde etkilemektedir. Sütlerdeki yağ oranı mevsimlere göre değişkenlik göstermektedir. Kış aylarında hayvanların daha çok konsantre yem ile beslenmesinden dolayı sütler daha yağlı olmaktadır (İnal, 1990; Metin, 2005; Walstra ve ark., 2006). Örneklerde belirlenen yağ oranının biraz yüksek olması örneklerin kış aylarında toplanmasına bağlanabilir ve bu durum İnal (1990) ve Metin'in (2005) kış mevsimde hayvanların daha çok konsantre yem ile beslenmesinden kaynaklı yağ miktarında artış olabilir ifadelerini destekler mahiyettedir.

Bu araştırmada incelenen çiğ inek sütü örneklerinde ortalama  $3.73 \pm 0.74$  olarak belirlenen yağ oranı Kesenkaş ve Akbulut (2010) ile Gemechu (2016) tarafından bildirilen değerlere benzerken, Türkoğlu ve ark. (2003), Özrenk ve Bayar (2008), Aydın ve ark. (2010), Hossain ve ark. (2011), Diler ve Baran (2014), Gemechu ve ark. (2015), Akın ve ark. (2016), Göncü ve ark. (2017) ile Tuncer ve ark. (2017) tarafından bildirilen değerlerden yüksektir.

Bu araştırmada belirlenen ortalama yağ oranı ile bazı çalışmalarda bildirilen yağ oranı arasındaki farklılıklar süt hayvanının ırk ve cinsinden, laktasyon periyodundan, hayvanlara yedirilen yemlerin özelliğinden veya farklı nedenlerden dolayı sütlerin yağının alınmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'nde (TGK, 2019) inek sütündeki yağ oranının en az %3.5 olması gerektiği belirtilmektedir. Bu araştırmada incelenen örneklerin 37'si (%61.66) yağ oranı yönünden ilgili standarda uygun bulunmuştur.

Sütte bulunan yağ, laktoz, kazein, serum proteinleri, mineraller ve vitaminler süttün kuru maddesini oluşturmaktadır. Bu bileşenlerin miktarlarının farklı nedenlerle değişmesi, süttün kuru madde miktarını önemli ölçüde etkilemektedir. Çiğ inek sütünde kuru madde oranı yaklaşık %12.6-12.7 arasında değişmektedir (Metin, 1998; Metin, 2005; O'Connor, 1994). Bu araştırmada incelenen süt örneklerinde ortalama kuru madde oranı  $12.95 \pm 1.72$  olarak tespit edilmiştir. Örneklerde tespit edilen ortalama kuru madde oranı Özrenk ve Bayar (2008), Şahin ve Kaşıkçı (2014) ile Gemechu ve ark. (2015) tarafından bildirilen değerlerden düşük, Türkoğlu ve ark. (2003), Kesenkaş ve Akbulut (2010), Tesfay ve ark. (2015), Akın ve ark. (2016), Gemechu (2016), Tankoano ve ark. (2016), Beykaya ve ark. (2017) ile Göncü ve ark. (2017) tarafından bildirilen değerlerden ise yüksek çıkmıştır. Araştırmalar arasındaki farklılıkların, incelenen süt örneklerinin beslenmeye bağlı olarak farklı miktarlarda besin elementleri içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

İnek sütünde yağsız kuru madde azotlu bileşikler, karbonhidratlar, suda eriyen vitaminler ve mineraller ile süt gazlarından oluşur. İnek sütünde yağsız kuru madde oranı %7.9-10.0 arasında ortalama %8.8 olmalıdır (Goff, 1995; Bilir-Ormancı, 2020). Yapılan bazı araştırmalarda (Beykaya ve ark., 2017; Göncü ve ark., 2017) sınırlı olarak değişkenlik gösteren süttün yağsız kuru maddesinin, süte yapılan hilelerin belirlenmesi açısından önemli olduğu belirtilmektedir. Bu araştırmada çiğ inek sütü örneklerinde ortalama yağsız kuru madde miktarı  $9.22 \pm 1.46$  olarak tespit edilirken, örneğin 26'sında yağsız kuru madde miktarı 6.650-8.80 arasında belirlenmiştir. İncelenen örneklerin %43.33'ünde yağsız kuru madde miktarlarının düşük çıkması, bu sütlerden farklı amaçlarla süt yağının alınmış olabileceğini düşündürmektedir.

Örneklerde tespit edilen ortalama yağsız kuru madde miktarı; Özrenk ve Bayar (2008), Diler ve Baran (2014) ile Akın ve ark. (2016) tarafından bildirilen değerler ile benzer, Türkoğlu ve ark. (2003), Aydın ve ark. (2010), Kesenkaş ve Akbulut (2010), Hossain ve ark., (2011), Şahin ve Kaşıkçı (2014), Gemechu ve ark. (2015), Tesfay ve ark. (2015), Gemechu (2016), Beykaya ve ark. (2017) ile Tuncer ve ark. (2017) tarafından bildirilen değerlerden ise yüksektir. İncelenen örneklerin bazılarında yağsız kuru madde değerlerinin çok düşük çıkması, bu sütlere su katılmış olma ihtimalini akla getirmektedir. Ayrıca, sütlerin yağsız kuru madde miktarlarının mevsimlere bağlı olarak hayvanlara verilen farklı yemlere göre de değişkenlikler gösterebildiği ifade edilmektedir (Jaurez ve ark., 1978; Kılıç ve Kılıç, 1994).

Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'ne (TGK, 2019) göre inek sütündeki yağsız kuru madde miktarının en az %8.5 olması gerektiği belirtilmektedir. Buna göre incelenen çiğ inek sütü örneklerinin 41'i (%68.33) yağsız kuru madde oranı yönünden ilgili standarda uygundur.

Tekinşen ve ark. (1997), rutubeti buharlaştırıldıktan ve organik kısımlarının yakılmasından sonra geriye kalan inorganik maddelerin miktarının belirlenmesi esasına dayanan sütün kül oranının genellikle %0.7-0.9 arasında değiştiğini belirtmektedirler. İncelenen çiğ inek sütü örneklerinde belirlenen ortalama kül miktarı (%0.68±0.16) Gemechu ve ark. (2015) ile Tesfay ve ark. (2015)'nin bildirdikleri değerlerden düşük, Hossain ve ark. (2011), Diler ve Baran (2014) ile Gemechu (2016) tarafından bildirilen değerlerden ise yüksektir. Kül miktarı yönünden gözlenen farklılıkların sütün inorganik madde içeriğinin hayvanın cinsi, bireysel özellikleri, laktasyon aşaması, yem, memenin enfeksiyonu ve mevsim gibi bir dizi faktörden etkilenmesine bağlanabilir.

Besleyici özellikleri yönünden önemli olan proteinlerin sütteki miktarı, süt hayvanının ırkı, laktasyon dönemi ve beslenmede kullanılan yemlerin özelliklerine göre değişkenlik gösterebilmektedir (Şekerden ve Öztürk, 1995; Campbell ve Marshall, 2016). İncelenen çiğ inek sütü örneklerinde ortalama protein oranı %3.59±0.41 olarak tespit edilmiştir. Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'ne (TGK, 2019) göre inek sütündeki protein oranı en az %2.8 olması gerektiği belirtilmiş olup, incelenen süt örneklerinin tamamı (%100) ilgili standarda uygun bulunmuştur.

Örneklerde tespit edilen ortalama protein oranı; Tesfay ve ark.'nın (2015) bildirdikleri değerden düşük, Türkoğlu ve ark. (2003), Özrenk ve Bayar (2008), Aydın ve ark. (2010), Kesenkaş ve Akbulut (2010), Hossain ve ark. (2011), Diler ve Baran (2014), Şahin ve Kaşıkçı (2014), Gemechu ve ark. (2015), Akın ve ark. (2016), Gemechu (2016), Göncü ve ark. (2017) ile Tuncer ve ark. (2017) tarafından bildirilen değerlerden yüksektir. Çalışmalarda elde edilen veriler arasındaki bu farklılıklar, hayvanların bireysel farklılıklarından veya hazırlanan rasyonlarındaki ham protein eksikliğinden kaynaklanabilir.

İncelenen örneklerde belirlenen kuru madde oranı ile yağ, yağsız kuru madde ve protein oranları arasında pozitif yönlü ve  $p<0.01$  düzeyinde, önemli bir istatistiksel ilişki belirlenmiştir. Elde edilen bu istatistiksel ilişki, sütte bulunan yağ, laktoz, kazein, serum proteinleri, mineraller ve vitaminlerin sütün kuru maddesini oluşturmasından, bu oranların

eksikliğinin ya da çokluğunun birbirini etkilemesinden kaynaklanabilir.

Örneklerde belirlenen ortalama yağsız kuru madde oranı ile rutubet arasında negatif yönlü önemli bir ilişki ( $p<0.01$ ) tespit edilmiştir. Bu istatistiksel ilişki, sütte suyun dışındaki bileşenlerin tamamını kuru madde oluşturduğundan su miktarı arttıkça kuru madde miktarının azalmasına bağlanabilir.

Süt sadece damak tadı için tüketilen bir gıda maddesi olmayıp özellikle bebekler, çocuklar ve yaşlılar olmak üzere insan sağlığına faydası açısından da oldukça kıymetli bir besin maddesidir. Çabuk bozulabilen çiğ sütün teknolojik işlemlerden geçirilmesi ve raf ömrünün uzatılması önemlidir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile incelenen çiğ sütün fizikokimyasal kalitesinin çok iyi olmadığı görülmüştür. Bu durumun genel olarak, sütlerin toplandığı çiftliklerin ve satıldığı bakkal ile marketlerin muhafaza şartlarının iyi olmamasından kaynaklanabileceği, sağım yapan personel ve sütün dağıtım sırasında muhafaza edilen kapların temizlikleri önem verilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır. Süt gerek içme sütü olarak kullanılacağına gerekse yoğurt, peynir gibi ürünler elde etmek için kullanılacağına kalitesi iyi olmalıdır. Bu sebeple, çiğ olarak tüketime sunulan sütün önemli bir bölümü küçük ölçekli aile işletmelerinden sağlandığı için, bu tür işletmelerin çiftlik koşullarının iyileştirilmesi, temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerine özen gösterilmesi gerekmektedir. Sokak sütü satıcılarının denetlenmesi artırılmalı ve süt satışına uygun olmayan yerlerin süt satmaları önlenmelidir. Bu nedenle, yasal otoriteler tarafından üretimden tüketime kadar her aşamada uygulanması gereken sıkı izleme ve denetim programlarının önemli olduğu düşünülmektedir.

## Teşekkür

Bu araştırma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TSA-2019-7895 nolu projenin bir kısmından gerçekleştirilmiştir. Destekleri için kuruma teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Akın MS, Yapık Ö, Akın MB, 2016: Adıyaman ilinde süt üretim çiftliklerinden ve toplayıcılardan sağlanan sütlerin bazı özellikleri. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 20 (4), 253-265.
- Alçıçek A, 1995: Beslemenin süt yağına etkileri. *Hasad Dergisi*, 117, 32-34.
- Anonymous, 1997: U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Pyramid Servins Data, Result from USDA's 1995 and 1996 Continuing Survey of Food Intakes by Individuals, Riverdale,

- MD: U.S. Department of Agriculture, December 1997.
- Aydın S, Çetinkaya A, Bayrakçı E, 2010: Kars ilinde üretilen inek sütlerinin bazı kimyasal özellikleri. Ulusal Meslek Yüksekokulları Öğrenci Sempozyumu, Düzce, Türkiye, p.1-7.
- Belbachir C, Khamri M, Saalaoui E, 2015: Microbiological quality of the raw cow milk at three rural communes of the eastern region of Morocco. *IFRJ*, 22 (4), 1675.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P, 2009: Food Chemistry. 4th revised and extended edition, Springer Science & Business Media, Germany.
- Beykaya M, Özbey A, Yıldırım Z, 2017: Sivas ilindeki bazı süt işletmelerine gelen sütlerin fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi. *TURJAF*, 5 (4), 388-396.
- Bilir-Ormanci FS, 1990: Sütün Tanımı, Genel Özellikleri ve Bileşimi In: Süt Hijyeni ve Teknolojisi, Bilir-Ormanci FS (Ed), 23-32, Ankara Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara.
- Campbell JR, Marshall RT, 2016: Dairy Production And Processing: The Science of Milk and Milk Products. Wavela nd Press, Inc.
- Chandan, RC, Shah, NP, 2006: Functional Foods and Disease Prevention In: Manufacturing Yogurt and Fermented Milks, Chandan RC (Ed), Blackwell Pub. UK, 311-325.
- Chavan, RS, Goyal MR, 2018: Technological Interventions in Dairy Science: Innovative Approaches in Processing, Preservation, and Analysis of Milk Products, Apple Academic Press Inc., USA.
- Davoodi H, Esmaili S, Mortazavian AM, 2013: Effects of milk and milk products consumption on cancer: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3), 249-264.
- Demirci M, Öksüz Ö, Şimşek O, Kurultay Ş, Kıvanç M, Gündüz HH, Uçan N, 2010: Süt ve Süt Ürünlerinin Kalite Kontrolü. Anadolu Üniversitesi Yayın No: 2064, p.254.
- Diler A, Baran A, 2014: Erzurum'un Hınıs ilçesi çevresindeki küçük ölçekli işletme tank sütlerinden alınan çiğ süt örneklerinin bazı kalite özelliklerinin belirlenmesi. *Alinteri Journal of Agriculture Sciences*, 26: 18-24.
- Gandhi K, Sharma R, Gautam PB, Mann B, 2020: Quality Assessment of Milk Products. In: Chemical Quality Assurance of Milk and Milk Products, 33-66, Springer, Singapore.
- Gemechu AT, 2016: Assessment of safety and quality of raw whole cow milk produced and marketed by smallholders in central highlands of Ethiopia Assessment. *Food Science and Quality Management*, 49, 63-71.
- Gemechu T, Beyene F, Eshetu M, 2015: Physical and chemical quality of raw cows milk produced and marketed in Shashemene Town, Southern Ethiopia. *ISABB Journal of Food and Agricultural Sciences*, 5 (2), 7-13.
- Goff D, 1995: Dairy Science and Technology Education Series University of Guelph Avakτήθηκαρό: <http://www.foodsciuguelph.ca/dei-con/rohtml>, Erişim tarihi; 29.06.2020
- Göncü B, Çelikel A, Akın MB, Akın MS, 2017: Şanlıurfa'da satışı sunulan sokak sütlerinin bazı kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. *HRU Muh Der*, 02, 15-23.
- Hossain TJ, Alam MK, Sikdar D, 2011: Chemical and microbiological quality assessment of raw and processed liquid market milks of Bangladesh. *Continental J Food Science and Technology*, 5, (2), 6-17.
- Hutkins RW, 2019: Microbiology and Technology of Fermented Foods. 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., London.
- İnal T, 1990: Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi. Final Ofset, İstanbul.
- Jaurez M, Castro, MI, Ramos, M, Anvarez MPJ, 1978: Composition of milk in Spain. 1. Main Componente, *Milchwissenschaft*, 33: 752-755.
- Karoui R, De Baerdemaeker J, 2007: A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chem*, 102: 621-640.
- Kaya MC, 2014: Durum ve Tahmin. Süt ve süt ürünleri 2014, Hazırlayan: Yasan Ataseven Z, Gülaç ZN, Tepge Yayın No: 233, Ankara.
- Kesenkaş H, Akbulut N, 2010: İzmir ilinde satılan sokak sütleri ile orta ve büyük ölçekli çiftliklerde üretilen sütlerin özelliklerinin belirlenmesi. *Ege Üniv Ziraat Fak Derg*, 47, 161-169.
- Kılıç A, Kılıç S, 1994: Yem(leme) ve Süt. Bilgehan Basımevi Bornova, İzmir, 288s.
- Kurt A, Çakmakçı S, Çağlar A, 2012: Süt ve Mamulleri Muayene ve Analiz Metotları Rehberi (Genişletilmiş 10. Baskı). AÜ Yay. No: 252/d, Ziraat Fak. Yay. No: 18, Erzurum.
- Mansour AIA, El- Loly MM, Ahmed RO, 2012: A preliminary detection of physical and chemical properties, inhibitory substances and preservatives in raw milk. *Internet J Food Safety*, 14: 93-103.
- Metin M, 1998: Süt Teknolojisi, Ege Üniv. Mühendislik Fakültesi Yay No:33 Bornova, İzmir.
- Metin M, 2005: Süt teknolojisi bileşimi ve işlenmesi. 6. Baskı, Ege Üniv. Mühendislik Fakültesi Yayınları, İzmir.
- Mudgil D, Mudgil SB, 2017: Objective Food Science & Technology, 2nd ed. Scientific Publishers, İndia.
- O'Connor CB, 1994: Rural dairy technology: ILRI Training Manual No. 1. International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia, pp. 133.
- Özrenk E, Bayar N, 2008: Konya yöresine ait sütlerin bazı kalite özellikleri. Türkiye 10 Gıda Kongresi Erzurum, pp. 695-696.
- Spreer E, 1998: Milk and Dairy Product Technology. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Şahin A, Kaşıkçı M, 2014: Sivas ili Yıldızeli ilçesinde halk elinde yetiştirilen esmer sığırların çiğ süt kompozisyonunu belirlenmesi. *JOTAF*, 11 (2), 44.
- Şekerden Ö, Özkütük K, 1995: Büyük Baş Hayvan Yetiştirme. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı No: 122, Adana.
- Tankoano A, Kabore D, Savadogo A, Soma A, Fanou-Fogny N, Compaore-Sereme D, Compaore-Sereme D, Hounhouigan JD, Sawadogo-Lingani, HE, 2016: Evaluation of microbiological quality of raw milk, sour milk and artisanal yoghurt from Ouagadougou, Burkina Faso. *Afr J Microbiol Res*, 10 (16), 535-541.

Tekinşen OC, Atasever M, Keleş A, 1997: Süt Ürünleri Üretimi ve Kontrolü. Selçuk Üniveritesi Basımevi, Konya.

Tekinşen OC, Atasever M, Keleş A, Tekinşen KK, 2002: Süt, Yoğurt, Tereyağı, Peynir Üretim ve Kontrol Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.

Tesfay T, Kebede A, Seifu E, 2015: Physicochemical properties of cow milk produced and marketed in Dire Dawa Town, Eastern Ethiopia. *Food Science Quality Management*, 42, 56-61.

Tuncer K, Kul E, Şahin A, 2017: TR71 bölgesindeki süt sığırları işletmelerinden toplanan çiğ sütlerin bazı kalite özelliklerinin belirlenmesi. *Mediterr Agric Sci*, 30, 1, 65-69.

Türk Gıda Kodeksi (TGK), 2019: Türk Gıda Kodeksi Çiğ süt ve ısıtılmış içme sütleri tebliği, 27.02.2019, 30699, Tebliğ No: 2000/6.

Türkoğlu H, Atasoy F, Özer B, 2003: Şanlıurfa ilinde üretilen ve satışa sunulan süt, yoğurt ve urfa peynirlerinin bazı kimyasal özellikleri. *HR Ü Z F Dergisi*,7: 69-76.

US Department of Agriculture (USDA), 1992: The Food Guide Pyramide. Home and Garden Bulletin, No: 252.

Walstra P, Geurts TJ, Noomen A, Jellema A, vanBoekel MAJS, 2006. Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes, CRC Press, USA.

**\*Yazışma Adresi:** Rabia Mehtap TUNCAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Van, Türkiye.

**e-mail:** r.m.gunes@yyu.edu.tr

## The Effect of Swimming Training on Adrenomedullin mRNA Levels in the Aorta, Kidney, and Adrenal Gland of L-NAME-induced Hypertensive Rats

Ece KOC YILDIRIM<sup>1,a,\*</sup>, Esra ORENLILI YAYLAGUL<sup>2,b</sup>, Mehmet KAYA<sup>3,c</sup>, Muharrem BALKAYA<sup>1,d</sup>, Celal ULGER<sup>4,e</sup>, Ferda BELGE<sup>1,f</sup>, Hümeýra UNSAL<sup>1,g</sup>, Cengiz UNSAL<sup>1,h</sup>, Mehmet EKICI<sup>5,k</sup>, Zahide DEDEOGLU<sup>3,l</sup>, İlkem CEYLAN<sup>4,m</sup>, Aykut Gokturk UNER<sup>1,6,n</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, Turkey

<sup>2</sup>Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, Turkey

<sup>3</sup>Department of Zootechny, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, Turkey

<sup>4</sup>Department of Biology, Faculty of Science and Arts, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, Turkey

<sup>5</sup>Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Sivas Cumhuriyet University, Sivas, Turkey

<sup>6</sup>Present address: Department of Endocrinology, Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, 330 Brookline Avenue, CLS-728-C4 Boston, USA

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-3208-6772, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-5206-1185, <sup>c</sup>ORCID: 0000-0003-2377-4474, <sup>d</sup>ORCID: 0000-0001-6819-9966, <sup>e</sup>ORCID: 0000-0002-8051-3003, <sup>f</sup>ORCID: 0000-0002-7577-7354, <sup>g</sup>ORCID: 0000-0001-8990-4556, <sup>h</sup>ORCID: 0000-0001-7584-0571, <sup>k</sup>ORCID: 0000-0002-2163-6214, <sup>l</sup>ORCID: 0000-0003-3522-4103, <sup>m</sup>ORCID: 0000-0002-4788-8989, <sup>n</sup>ORCID: 0000-0002-9242-8279

Geliş Tarihi: 24.03.2021

Kabul Tarihi: 15.10.2021

**Abstract:** Adrenomedullin, which is produced by the vascular endothelial and smooth muscle cells and cardiomyocytes, is considered to be a local factor controlling vascular tone, cardiac contractility, and renal sodium excretion. Hypertension is the most common cause of cardiovascular disorders and diseases. Exercise has beneficial effects on hypertension, but pathophysiological factors involved in exercise-mediated amelioration of hypertension are yet to be elucidated. We hypothesized that adrenomedullin produced through exercise could play an essential role in the protection from hypertension. For this study rats were subjected to swimming training for six weeks (1-h per day and five times each week). Meanwhile, hypertension was induced by the oral administration of L-NAME (60 mg/kg). Here, we show that L-NAME administration *per se* leads to a significant increase in mean arterial blood pressure. Notably, the 6-week swimming exercise causes a protective effect from the development of hypertension. In addition, the rats rescued from hypertension have high mRNA levels of renal adrenomedullin while they have low levels of adrenomedullin mRNA in the aorta. The obtained data indicate that a 6-week exercise intervention rescues rats from high blood pressure by leading to changes in adrenomedullin levels in the aorta and kidney. The increased expression of adrenomedullin in the aorta might have been a result that compensates for the hypertensive effect of L-NAME. On the other hand, exercise probably exerts its protective effects on hypertension by increasing adrenomedullin in the kidney. A more extended exercise period may give more apparent results regarding the level of adrenomedullin in different organs.

**Keywords:** Adrenomedullin; hypertension; L-NAME; mRNA; Swimming training.

### L-NAME İndüksiyonu ile Oluşturulan Hipertansiyon Modelinde Yüzme Egzersizinin Aorta, Böbrek ve Adrenal Bez Adrenomedüllin mRNA Düzeylerine Etkisi

**Özet:** Adrenomedullin, vasküler gerim, kardiyak kontraktilite ve renal sodyum atılımında rolü olduğu ileri sürülen, vasküler endotelial ve düz kas hücreleri ile kardiyomyositlerden eksprese olan bir hormondur. Hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıkların en yaygın nedenidir. Egzersizin hipertansiyon üzerinde yararlı etkileri bulunmaktadır ancak egzersiz-aracılı düzelmeyi sağlayan halen daha açıklanmamış patofizyolojik mekanizmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmada, egzersizin hipertansiyon üzerindeki etkisinde adrenomedullinin aracılık ettiği düşünülmektedir. Bu amaçla sıçanlara 6 hafta boyunca yüzme egzersizi (haftada 5 gün, 1 saat süreyle) uygulandı. Hipertansiyon, L-NAME'in oral yolla (60 mg/kg) verilmesiyle indüklendi. L-NAME uygulaması hipertansif grupta ortalama kan basıncını belirgin olarak artırdı. Ayrıca, egzersiz L-NAME indüksiyonu yapılan sıçanlarda renal adrenomedullin mRNA düzeyinde artışa neden olarak koruma sağlarken, aortada adrenomedullin mRNA ekspresyonunu düşürdü. Elde edilen bu veriler 6-haftalık yüzme egzersizin aorta ve böbrekte adrenomedullin ekspresyonunu değiştirerek hipertansiyona karşı koruma sağladığına işaret etmektedir. Aortadaki adrenomedüllin artışının hipertansiyonu kompanze etmek için artmış olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanında, yüzme egzersizi muhtemelen böbrek adrenomedüllin düzeyini artırarak hipertansiyon üzerindeki koruyucu etkisini göstermektedir. Daha uzun bir egzersiz süresi, farklı organlardaki adrenomedüllin düzeyi hakkında daha net sonuçlar verebilir.

**Anahtar kelimeler:** Adrenomedullin; Hipertansiyon, L-NAME; mRNA; Yüzme egzersizi.



## Introduction

Adrenomedullin is a hormone with a potent vasodilator effect, consisting of 52-aminoacid discovered in human pheochromocytoma tissue (Kitamura et al., 1993a). It has since been reported that adrenomedullin can be synthesized by numerous tissues, such as the heart, adrenal medulla, kidney, smooth muscle and vascular endothelial cells, neurons, and fibroblasts (Kitamura et al., 1993a; Kitamura et al., 1993b; Satoh et al., 1995; Sugo et al., 1994a; Sugo et al., 1994b). The most well-known function of adrenomedullin is vasodilation in vascular resistance and capacitance. Adrenomedullin lowers blood pressure; however, it interestingly increases blood flow (Kitamura et al., 1993a). Besides its vasodilatory effects, adrenomedullin is thought to have an essential role in protecting endothelial integrity (Voors et al., 2019).

Hypertension is one of the significant risk factors for cardiovascular morbidity (Boutcher and Boutcher, 2017), which causes drastic changes in various organs such as the kidneys, heart, vessels, eyes and eventually increases the risk of health complications. It is estimated that more than one billion of the world population is hypertensive (Moraes-Silva et al., 2017). Not only does hypertension treatment fail to result in a fast response, but also it costs substantially. Therefore, non-pharmacological approaches, including reducing salt intake and alcohol consumption, quitting smoking, losing weight, changing diet, and doing regular exercise, are encouraged (Mancia et al., 2014). Exercise is a crucial component of lifestyle therapy for the primary prevention and treatment of hypertension. The effects of exercise on hypertension could be seen due to alterations in different physiopathological mechanisms, such as the reduced peripheral vascular resistance (Rueckert et al., 1996), increased vasodilator bioavailability (Nyberg et al., 2012), and improved the countenance between antioxidant systems and reactive oxygen species formation (Higashi and Yoshizumi, 2004). Exercise also causes beneficial changes in some vasoconstrictor peptides such as reductions in serum endothelin-1 levels (Nyberg et al., 2013). In addition, exercise may have crucial effects on hypertension by increasing known circulating peptides (e.g., atrial natriuretic peptide) (Sarzani et al., 2017), but the involvement of adrenomedullin remains unclear.

## Materials and Methods

**Experimental Animals and Design:** The present study was approved by Aydin Adnan Menderes

University Animal Care and Ethical Committee (ADÜ-HADYEK-Approval No: 64583101/2016/189).

A total of twenty-eight male Sprague Dawley, eight weeks of age, rats were given *ad libitum* food and tap water, housed at  $22\pm 2$  °C temperature, 50-70% humidity and a 12 / 12 hours' light / dark cycle throughout the experiment. The rats were divided randomly into four groups (7 animals/each group); control (C), exercise (E), hypertensive (L), and hypertensive + exercise (LE). The oral administration of L-NAME at a dose of 60 mg/kg every other day for six weeks induced hypertension (Koc Yildirim et al., 2021). The C and E groups were applied orally to drinking water to induce similar stress.

**Training Protocol:** All rats were adapted to water before starting the experiment. For this, rats were kept in shallow water for 1 hour 5 times a week (Souza et al., 2009). After that, the rats were floated five times a week for 1 hour for six weeks. The workload was bound to the rats' tails as 2% of the body weight from the second week of the exercise and 5% of the body weight in the following weeks. Rats in control and hypertensive groups were kept in shallow water for similar periods.

**Determination of Hemodynamic Parameters:** Tail-cuff plethysmograph (NIBP200A, Commat Ltd, Turkey) used to record systolic and diastolic blood pressures (SP and DP) from the tail in the awake rats once a week. SP and DP were measured as described earlier (Koc Yildirim et al., 2021). A standard method used to estimate the MAP was calculated (DeMers and Wachs, 2020):  $MAP = DP + 1/3(SP-DP)$ .

**qRT-PCR:** The adrenal gland, thoracic aorta, and kidney samples were collected after the rats were sacrificed by cervical dislocation under deep anesthesia. Total RNA of kidney, adrenal and thoracic aorta were extracted exploiting the TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) concerning the producer's directives. 1 µg total RNA was made to use to be reverse-transcribed cDNA from using the GeneAll HyperScript™ Reverse Transcriptase (GeneAll, Korea) with oligo dT and random hexamer primers in reaction volume as described by the manufacturer. SYBR Green PCR Master Mix was used to carry out qRT-PCR (GeneAll, Korea). GAPDH was used as an endogenous control. StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA) was used to analyze each sample in triplicate. The PCR circumstances were performed as follows: 10 min at 95 °C, 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 60 s, respectively. Gene copy number data was determined by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak

and Schmittgen, 2001) reference to the GAPDH expression compared with the control. Primers sequences for adrenomedullin and GAPDH were respectively: forward 5' - CAG GAC AAG CAG AGC ACG TC - 3', reverse 5' - TCT GGC GGT AGC GTT TGA C - 3', 82bp (Li et al., 2010); forward 5' - TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC - 3', reverse 5' - GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG - 3', 87bp (Sun et al., 2012).

**Statistical Analyses:** The SPSS software (22.0) was used to perform statistical analyses. Shapiro-Wilk's test was used to detect whether or not the dependent variables were normally distributed. Repeated-measures 2-way ANOVA commented the change in mean arterial pressures by the time. The general linear model (GLM) procedures were used to do post hoc analyses when the effect of the intervention and interaction is significant. Correlations were assessed using Pearson's correlation analyses according to the distribution of

the data. The results are shown as means  $\pm$  SEM.  $P \leq 0.05$  was considered significant.

## Results

In the present study, the administration of L-NAME caused a significant increase in MAP ( $P_{\text{group}} < 0.001$  and  $P_{\text{interaction}} = 0.001$ ) compared with the rats that did not receive L-NAME, which shows that hypertension was successfully induced. Furthermore, during the 6-week experimental period, the MAP of L-NAME-treated rats significantly ( $P < 0.001$ ) increased over time. On week 6, there was no difference between control rats and the rats subjected to both L-NAME administration and swimming training, suggesting that the 6-week swimming training returned blood pressure to normal (Table 1).

**Table 1.** Mean arterial pressure (MAP) (mmHg).

Group	MAP0	MAP1	MAP2	MAP3	MAP4	MAP5	MAP6
Control	92 $\pm$ 5	95 $\pm$ 6	95 $\pm$ 2	92 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	96 $\pm$ 4	92 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	101 $\pm$ 5 <sup>bc</sup>
Exercise	87 $\pm$ 2	94 $\pm$ 5	92 $\pm$ 3	103 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	100 $\pm$ 4	95 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	91 $\pm$ 2 <sup>c</sup>
L-NAME+Exercise	87 $\pm$ 6	103 $\pm$ 6	99 $\pm$ 5	123 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	98 $\pm$ 7	105 $\pm$ 4 <sup>ab</sup>	112 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
L-NAME	84 $\pm$ 9	107 $\pm$ 6	102 $\pm$ 4	127 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	112 $\pm$ 6	113 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	127 $\pm$ 5 <sup>a</sup>
Significance	NS	NS	NS	$P < 0.001$	NS	$P < 0.01$	$P < 0.001$

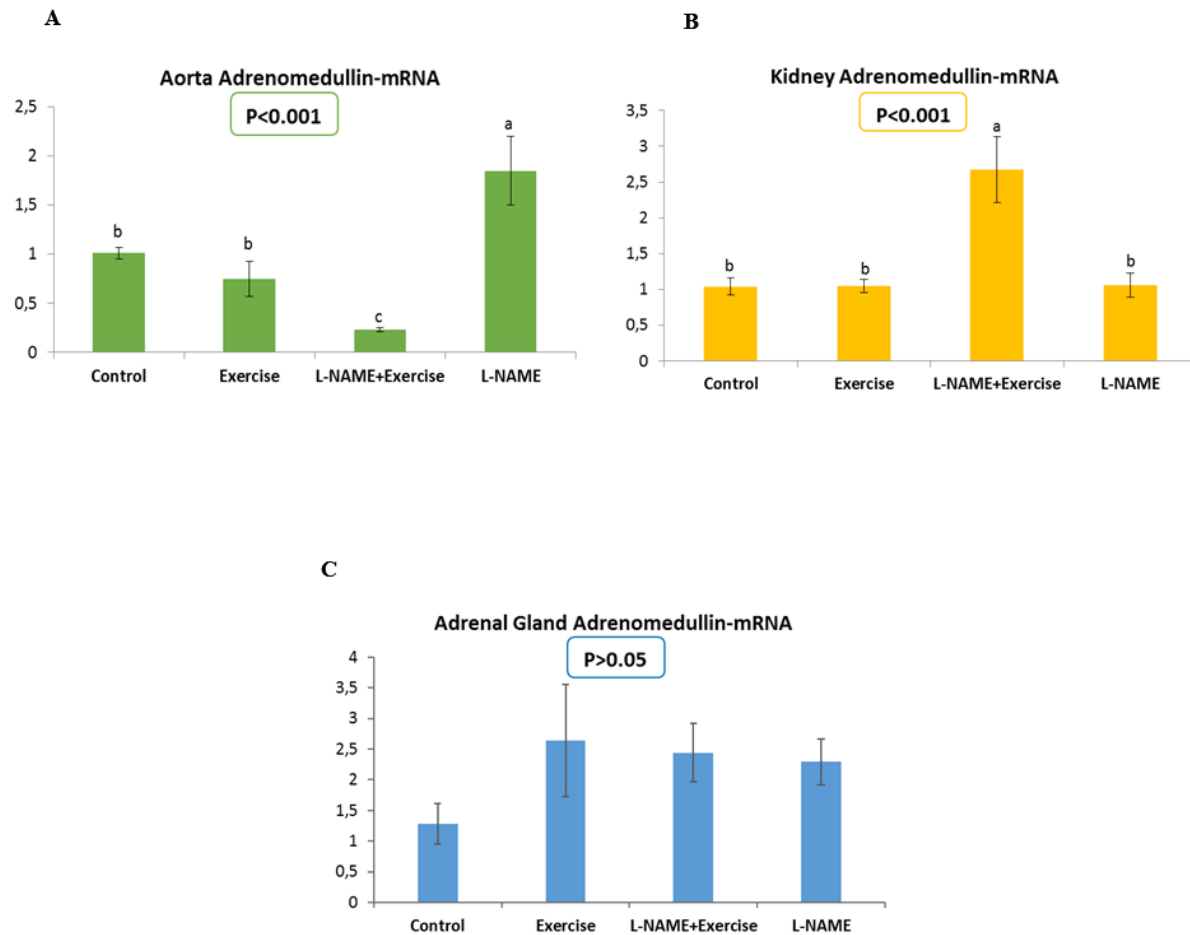
<sup>a, b, c</sup> Means bearing different superscripts within the same week differ significantly. NS: not significant. Data are shown as means  $\pm$  SEM.

Adrenomedullin mRNA levels of the thoracic aorta in hypertensive rats were found higher than the other groups ( $P < 0.001$ ) (Figure 1A). Adrenomedullin mRNA in the aorta was marked lower in the LE group than that of the other groups ( $P < 0.001$ ) (Figure 1A). Interestingly, renal adrenomedullin mRNA levels were significantly increased in the LE group ( $P < 0.001$ ) (Figure 1B). The unexpected result of the adrenomedullin mRNA concentrations might be due to a compensatory effect. Adrenal adrenomedullin mRNA expressions did not exhibit to be different between groups of (Figure 1C). Correlation analysis also indicated that there was no relationship between adrenomedullin mRNA expression of selected organs (aorta, kidney, and adrenal gland) and MAP on week 6 ( $r_p = 0.334$ ;  $r_p = 0.125$ ;  $r_p = -0.058$ , respectively,  $P > 0.05$ ).

## Discussion and Conclusion

Exercise has reduced blood pressure in humans and experimental animals (Diaz and Shimbo, 2013). In this study, 6-week regular swimming exercises significantly decreased MAP in hypertensive rats with induced LNAME, consistent with other studies using rats with spontaneous hypertension (Rodrigues et al., 2018) and with hypertension induced by L-NAME (Cardoso et al., 2014).

It is thought that adrenomedullin, a product of the cardiovascular system, may also have essential roles in regulating of blood pressure (Wong et al., 2012). In hypertension and organ protection, the infusion of chronic adrenomedullin and endogenous adrenomedullin could have beneficial effects (Nagaya et al., 2000; Wong et al., 2012). In the



**Figure 1.** Adrenomedullin mRNA expression in the aorta (A), kidney (B), and adrenal gland (C). <sup>a, b, c</sup>Means bearing different superscripts between the groups differ significantly.

present study, adrenomedullin mRNA expression in the aorta was distinctly increased in the L-NAME-induced hypertensive rats. This result confirms previous studies (Pan et al., 2006; Qi et al., 2003), which suggest that the increased adrenomedullin mRNA might have been a result that compensates the hypertensive effect of L-NAME via its hypotensive, natriuretic, and diuretic actions. Since adrenomedullin has a vasodilatory effect, it is possible that swimming training might induce adrenomedullin levels in the aorta to decrease high blood pressure. However, the results were opposite to this direction which suggest that adrenomedullin in the aorta may not directly be involved in anti-hypertensive actions of swimming training. The reason that adrenomedullin mRNA levels decreased in the aorta could be due to shear stress in the hypertensive vessel (Shinoki et al., 1998). In addition, exercise lowers adrenomedullin mRNA levels of the heart which further confirms that the reduction in adrenomedullin of the circulatory tissues responds to hypertensive stress (Iemitsu et al., 2001).

On the other hand, unlike the aorta, exercise increased in renal adrenomedullin mRNA expression in the rats who received L-NAME, indicating that swimming exercise probably exerts its protective effects on hypertension by increasing adrenomedullin in the kidney. Further studies should confirm this by measuring blood and renal adrenomedullin levels. Another explanation of why renal adrenomedullin mRNA levels increased might be renal vasculature alterations in L-NAME-induced hypertension states (Raine, 1994). Glomerular capillary hypertension and glomerular damage are also induced by chronic inhibition of NO synthesis, compared to systemic hypertension (Baylis et al., 1992) that might cause an increase in adrenomedullin levels in the kidney, which is an opposite response to that of the aorta. Even though studies suggesting that exercise plays a protective role against renal damage in hypertension (Peeri et al., 2013), some studies that suggest that exercise increases glomerulosclerosis (Kuru et al., 2005) because of elevated renal sympathetic activity and endothelin-1 levels during training and the activation of the rennin-angiotensin system (Kuru et

al., 2005) which might eventually result in renal damage leading an increase in ADM expression in the kidney (Kohno et al., 1995; Yamaguchi et al., 1996).

The findings indicate that L-NAME-induced hypertension is prevented, and blood pressure is decreased by exercise, likely by changing adrenomedullin levels in different tissues. Prolonging the exercise period may give a more effective result on the expression of adrenomedullin in different organs. Further studies will elucidate whether the possibility that adrenomedullin might have antihypertensive effects could lead to a promising target for novel anti-hypertensive medicines. In addition, our results are thought to promote the continuous search intensively for the mechanisms of non-pharmacological antihypertensive treatment.

### Acknowledgements

This study was supported by the grant (VTF-17023 to E.K.Y.) of Aydin Adnan Menderes University. We thank Amanda Chilaka (Whitehead Institute, Boston, MA) for editing the manuscript.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest. The sponsors had no role in the design, execution, interpretation, or writing of the study.

### References

- Baylis C, Mitruka B, Deng A, 1992: Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest*, 90 (1), 278–281.
- Boutcher YN, Boutcher SH, 2017: Exercise intensity and hypertension: what's new? *J Hum Hypertens*, 31 (3), 157–164.
- Cardoso AM, Abdalla FH, Bagatini MD, Martins CC, Fiorin F, Baldissarelli J, Costa P, Mello FF, Fiorenza AM, Serres JD, Gonçalves JF, Chaves H, Royes LF, Belló-Klein A, Morsch VM, Schetinger MR, 2014: Swimming training prevents alterations in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 27 (4), 522–529.
- DeMers D, Wachs D, 2020: Physiology, Mean Arterial Pressure. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 1-8.
- Diaz KM, Shimbo D, 2013: Physical activity and the prevention of hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 15 (6), 659-68.
- Higashi Y, Yoshizumi M, 2004: Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacol Ther*, 102 (1), 87–96.
- Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Kobayashi T, Fujii N, Miyazaki H, Matsuda M, Yamaguchi I, 2001: Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281 (6), R2029–R2036.
- Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T, 1993a: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 192 (2), 553–560.
- Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T, 1993b: Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun*, 194 (2), 720–725.
- Koc Yildirim E, Dedeoglu Z, Kaya M, Uner AG, 2021: The effect of swimming training on adrenomedullin levels, oxidative stress variables, and gastrocnemius muscle contractile properties in hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*, Feb 17;43 (2):131-137.
- Kohno M, Kano H, Horio T, Yokokawa K, Yasunari K, & Takeda T, 1995: Inhibition of endothelin production by adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Hypertens*, 25 (6), 1185–1190.
- Kuru O, Sentürk UK, Gülkesen H, Demir N, Gündüz F, 2005: Physical training increases renal injury in rats with chronic NOS inhibition. *Renal failure*, 27 (4), 459–463.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method *Methods*, 25 (4), 402–408.
- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, et al., 2013: Task Force Members 2013: 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*, 31 (7), 1281–1357.
- Moraes-Silva IC, Mostarda CT, Silva-Filho AC, Irigoyen MC, 2017: Hypertension and Exercise Training: Evidence from Clinical Studies. *Adv Exp Med Biol*, 1000, 65–84.
- Nagaya N, Satoh T, Nishikimi T, Uematsu M, Furuichi S, Sakamaki F, Oya H, Kyotani S, Nakanishi N, Goto Y, Masuda Y, Miyatake K, Kangawa K, 2000: Hemodynamic, renal, and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circ*, 101 (5), 498–503.
- Nyberg M, Al-Khazraji BK, Mortensen SP, Jackson DN, Ellis CG, Hellsten Y, 2013: Effect of extraluminal ATP application on vascular tone and blood flow in skeletal muscle: implications for exercise hyperemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 305 (3), R281–R290.
- Nyberg M, Jensen LG, Thaning P, Hellsten Y, & Mortensen SP, 2012: Role of nitric oxide and prostanoids in the regulation of leg blood flow and blood pressure in humans with essential hypertension: effect of high-

- intensity aerobic training. *J Phys*, 590 (6), 1481–1494.
- Pan C, Jiang W, Wu S, Zhao J, Pang YZ, Tang C, Qi YF, 2006: Potentiated response to adrenomedullin in myocardia and aortas in spontaneously hypertensive rat. *Basic Res Cardiol.*, 101 (3), 193–203.
- Peeri M, Habibian M, Azarbayjani MA, & Hedayati M, 2013: Protective effect of aerobic exercise against L-NAME-induced kidney damage in rats. *Arh Hig Rada Toksikol*, 64 (2), 43–49.
- Qi YF, Bu DF, Shi YR, Li JX, Pang YZ, Tang CS, 2003: Levels of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in myocardium and aorta of spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats. *Sheng Li Xue Bao*, 55 (3), 260–264.
- Raine AE, 1994: Hypertension and the kidney. *Br Med Bull*, 50 (2), 322–341.
- Rodrigues JA, Primola-Gomes TN, Soares LL, Leal TF, Nóbrega C, Pedrosa DL, Rezende L, Oliveira EM, & Natali AJ, 2018: Physical Exercise and Regulation of Intracellular Calcium in Cardiomyocytes of Hypertensive Rats. *Arq Bras Cardiol*, 111 (2), 172–179.
- Rueckert PA, Slane PR, Lillis DL, Hanson P, 1996: Hemodynamic patterns and duration of post-dynamic exercise hypotension in hypertensive humans. *Med Sci Sports Exerc*, 28 (1), 24–32.
- Sarzani R, Spannella F, Giulietti F, Balianetti P, Cocci G, Bordicchia M, 2017: Cardiac Natriuretic Peptides, Hypertension and Cardiovascular Risk. *High Blood Press & Cardiovas Prev*, 24 (2), 115–126.
- Satoh F, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Ohneda M, Abe K, Miura Y, Hayashi Y, Sasano H, 1995: Adrenomedullin in human brain, adrenal glands and tumor tissues of pheochromocytoma, ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 80 (5), 1750–1752.
- Shinoki N, Kawasaki T, Minamino N, Okahara K, Ogawa A, Ariyoshi H, Sakon M, Kambayashi J, Kangawa K, Monden M, 1998: Shear stress down-regulates gene transcription and production of adrenomedullin in human aortic endothelial cells. *J Cell Biochem.*, 71 (1), 109–115.
- Souza MA, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, Dalla Corte LC, Silva LF, Retamoso LT, Dalla Corte CL, Puntel GO, de Avila DS, Soares FA, Figuera MR, de Mello CF, Royes LF, 2009: Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia*, 50 (4), 811–823.
- Sugo S, Minamino N, Kangawa K, Miyamoto K, Kitamura K, Sakata J, Eto T, Matsuo H, 1994a: Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun*, 201 (3), 1160–1166.
- Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T, Matsuo H, 1994b: Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells: augmented production by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun*, 203 (1), 719–726.
- Sun HK, Lee YM, Han KH, Kim HS, Ahn SH, Han SY, 2012: Phosphodiesterase inhibitor improves renal tubulointerstitial hypoxia of the diabetic rat kidney. *Korean J Intern Med*, 27 (2), 163–170.
- Voors AA, Kremer D, Geven C, Ter Maaten JM, Struck J, Bergmann A, Pickkers P, Metra M, Mebazaa A, Düngen HD, & Butler J, 2019: Adrenomedullin in heart failure: pathophysiology and therapeutic application. *Eur J Heart Fail*, 21 (2), 163–171.
- Wong HK, Cheung TT, Cheung BM, 2012: Adrenomedullin and cardiovascular diseases. *JRSM Cardiovasc Dis*, 1(5), cvd.2012.012003.
- Yamaguchi T, Baba K, Doi Y, Yano K, Kitamura K, Eto T, 1996: Inhibition of aldosterone production by adrenomedullin, a hypotensive peptide, in the rat. *Hypertens*, 28 (2), 308–314.

\*Correspondence: ECE KOC YILDIRIM

Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Aydin Adnan Menderes University, Aydin, Turkey.

e-mail: vetece04@hotmail.com.tr

## Aydın İli Söke İlçesinde Sütçü İneklerde Subklinik Mastitis Prevalansının ve Mastitise Neden Olan Aerobik Bakterilerin Belirlenmesi \*

Özkan ÇELİK<sup>1,a</sup>, Erdem SUR<sup>2,b</sup>, Hayrettin ÇETİN<sup>1,c,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

<sup>2</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-9312-0815, <sup>b</sup>ORCID:0000-0002-9383-7146, <sup>c</sup>ORCID:0000-0001-9010-0993

Geliş Tarihi: 09.04.2021

Kabul Tarihi: 09.10.2021

**Özet:** Bu çalışmada, Aydın ili Söke ilçesinin farklı mahallelerinde bulunan Siyah-Alaca ineklerde subklinik mastitis oranının belirlenmesi ve subklinik mastitise neden olan bakterilerin sekans analizi ile moleküler identifikasyonlarının yapılması amaçlandı. Materyal olarak 312 baş Siyah-Alaca ineğin 1231 meme lobu kullanıldı. California Mastitis Test (CMT) sonucunda, ineklerin %72,44'ünün ve meme loblarının %46,63'ünün subklinik mastitisli olduğu belirlendi. California Mastitis Testi pozitif 226 inekten aseptik şartlarda alınan süt numunelerinin 128'inde (%56,64) patojen mikroorganizmalar tespit edilirken 98'inde (%43,36) besi yerinde patojen etken üremedi. Yüz yirmi sekiz numuneden, 178 adet mikroorganizma ürettiği, bunlardan 77'sinin (%43,75) bulaşıcı, 99'unun (%56,25) çevresel mastitis grubu bakteri, ikisinin ise maya olduğu tespit edildi. *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. ve koliform grubu bakterilerin en çok identifiye edilen türler olduğu görüldü. Atlık materyali olarak gübrenin kullanıldığı işletmelerde, çevresel mastitis etkenlerinin subklinik mastitiste başlıca risk faktörü olduğu tespit edildi. Kauçuk altlık kullanılan işletmelerde subklinik mastitisin önemli derecede azaldığı tespit edildi (P<0.001). Aydın ili Söke ilçesinde subklinik mastitisin önemli bir sorun olduğu, ayrıca yetiştiricilerin hastalığın tanı, tedavi ve daha önemlisi koruma-kontrol yolları hakkında yeterli bilgiye sahip olmadıkları belirlendi. Belirli aralıklarla subklinik mastitis taraması yapılması, etken izolasyonu ve identifikasyonu ile mastitise karşı alınacak tedbirlerin, işletmelerin karlılığı ve sürdürülebilirliği için önemli olduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** California Mastitis Test, Moleküler identifikasyon, Subklinik mastitis.

### Determination of Subclinical Mastitis Prevalence and Aerobic Bacteria Causing Mastitis in Dairy Cows in Soke District of Aydın

**Abstract:** This study aimed to determine the prevalence of subclinical mastitis in Holstein cows in different districts of Soke, Aydın and to identify sequence analysis of bacteria causing subclinical mastitis. A total of 1231 samples from 312 Holstein cows were screen with California Mastitis Test (CMT) in this study. Based on CMT results, 72.44% of cows and 46.63% of mammary lobes had subclinical mastitis. Pathogenic microorganisms were detected in 128 (56.64%) of the aseptic milk samples taken from 226 CMT-positive cows, whereas 98 (43.36%) of them had negative results. The culture analysis showed 178 microorganisms of 128 samples, of which 77 (43.75%) were contagious, 99 (56.25%) were environmental mastitis group bacteria, and 2 were yeast. *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. and the coliform group were the most identified species. It was concluded that environmental mastitis agents were risk factors for subclinical mastitis in the dairy farms where manure was used as a flooring material. Subclinical mastitis was found to be significantly reduced in the barns where rubber (latex) mat was used as floor material (P<0.001). The present study reports a high prevalence of subclinical mastitis in Soke district of Aydın province. The breeders do not have enough information about the diagnosis, treatment and more importantly protection, and control of the disease. The findings of the study concluded that screening of subclinical mastitis at regular intervals, isolation and identification of agents should be focused and measures of regular screening for mastitis are essential for the profitability and sustainability of the dairy farms.

**Keywords:** California Mastitis Test, Molecular identification, Subclinical mastitis.

### Giriş

Süt sığırı işletmelerinde kârlı bir üretim yapmak için kaliteli ve sağlıklı sütün elde edilmesi gerekmektedir. Dünya nüfusunun artmasıyla süt ve süt ürünlerine olan talep de artmaktadır. Bu talebi karşılamak için hastalıklara karşı dirençli, yüksek süt verimine sahip hayvan sayısını artırmak amacıyla birçok ıslah çalışmaları yapılmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu (2019) verilerine göre 2000 yılında

birim hayvan başına yıllık süt üretimi 1.654 kg iken, 2018 yılında 3.161 kg'a yükselmiştir. Bu yükseliş, ırk seleksiyonu ile kültür ırklarımız ve melezlerinin toplam hayvan varlığımızdaki oranının artması, küçük işletmelerin yerlerini yavaş yavaş daha büyük işletmelerin alması, bu sayede daha bilinçli ve korumaya yönelik yapılan birçok uygulama ile sağlanmıştır.



Mastitisin; süt üretiminin düşmesi, sütün kalitesindeki değer kaybı, sütün satış değerindeki azalma, emek ve zaman kaybı, ilaç ve tedavi giderleri, elde edilen sütün dökülme zorunluluğu nüks oranının yüksek olması, ineğin sürüden erken çıkartılması (%21-39,4) gibi birçok ekonomik zararı vardır (Awale ve ark, 2012; Guimaraes ve ark, 2017; Hertl ve ark, 2018; Keskin, 2015; Taponen ve ark, 2017; Viguier ve ark, 2009). Çek Cumhuriyet’inde (Wolfova ve ark, 2006), düzenli olarak kayıt tutulan beş siyah-alaca sütçü inek işletmesinde, çeşitli hastalıkların tedavilerine yönelik giderlerin tümü içinde sadece mastitis vakaları için %38’den fazla bir pay ayrıldığı ifade edilmektedir. Farklı ülkelerde birçok araştırmacının yapmış olduğu incelemelerde mastitisli ineklerde yıllık 250-1277 kg süt kaybı olduğu belirlenmiştir (Hortet ve Seegers, 1998; Lucey ve ark, 1986; Mtallah ve ark, 2002; Schepers ve Dijkhuizen, 1991). Bu nedenle mastitis ile mücadelede etkenlerin çok iyi tanınması ve bunlara yönelik önlemlerin alınması gerekmektedir (Vural ve ark, 2016).

Sunulan çalışmada, Aydın ili Söke ilçesinde, süt hayvancılığı yapan işletmelerde subklinik mastitis oranını ortaya çıkarmak ve subklinik mastitise neden olan mikroorganizmaları tespit etmek amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapılan başvuruda, deney hayvanı kullanılmadığı için, onay gerekmediği raporu alınmıştır (64583101/2018/003). Çalışmanın materyalini Aydın ili Söke ilçesinin 10 farklı mahallesinde bulunan, 27 işletmede, genel durumu sağlıklı görülen 312 Siyah-Alaca Holstein ineğe ait 1231 meme lobu oluşturdu. Çalışma 2019 yılı Nisan-Mayıs ayları arasında gerçekleştirildi.

Mastitis taraması için gidilen süt işletmelerinde sağım için hazırlanan ineklerin normal meme temizliği yapıldıktan sonra California Mastitis Testi (*Bovivet CMT Liquid, Kruuse®*) ile mastitis teşhisi yapıldı. Test sonucu pozitif veren meme lobları ve dereceleri, Vural ve ark. (2016) tarafından belirtilen yöntemle göre değerlendirildi. Numune göndermek için ilk olarak CMT derecesine bakılmaksızın pozitif çıkan sağ arka meme lobu seçildi. Sağ arka meme lobu CMT negatif çıkan ineklerde test için diğer meme loblarında CMT pozitiflik derecesi en yüksek olan seçilerek 5-10 ml süt, aseptik koşullarda laboratuvara gönderildi.

**İzolasyon ve İdentifikasyon:** Süt örnekleri soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırıldıktan sonra genel (%7 kanlı agar) ve selektif (MacConkey Agar) besiyerlerine ekilerek izolasyonları yapıldı (Quinn ve ark. 2011). İzole edilen bakterilerin tür

düzeyinde identifikasyonlarında sekans analizi kullanıldı.

**DNA Ekstarksiyonu:** İzolatların total DNA ekstraksiyonu ticari genomik DNA ekstraksiyon kiti (*InstaGeneMatrix, Katalog No: 732-6030, BIO-RAD®, München, Germany*) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi.

**Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):** Ekstraksiyonu yapılan DNA’lar üniversal primerler (16S20 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3' ve 16S1390 5'-GAC GGG CGG TGT GTA CAA-3') kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye edildi (Edwards ve ark. 1989; Zheng ve ark. 1996). Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile 16S rRNA geninin çoğaltılmasında, elde edilen bakteriyel DNA’dan 2 µL olacak şekilde toplam 30 µL reaksiyon miktarı için son konsantrasyon Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, magnezyum klorür (MgCl<sub>2</sub>) 2 mM, dNTP 0,2mM, primer (her biri için) 0,4 pmol, Taq DNA polimeraz (Fermentas) 1,5 U olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. Program 95°C’da beş dakikalık ön denatürasyonu takiben 35 siklus 95°C 30 sn, 56°C 30 sn ve 72°C 1 dakikada tamamlandıktan sonra, 72°C’de 7 dakika ile sona erdirildi. Polimeraz Zincir Reaksiyonu’nda beklenen büyüklükte (1371 bp) bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi. Amplifikasyon ürünü daha sonra sekanslama için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi ve sonuçlar NCBI (National Center for Biotechnological Information) nükleotid blast programında gen bankasıyla karşılaştırıldı.

**İstatistiksel Analiz:** Elde edilen veriler SPSS 22.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, Amerika) programı kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arasında frekanslar bakımından farklar Ki-kare testi ile karşılaştırıldı. Elde edilen P değerinin 0,05’in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

## Bulgular

**Klinik Muayene ve CMT Bulguları:** Muayene edilen 312 ineğin 1248 meme lobundan 17’si (%1,36) kör olarak kaydedildi. Süt verimi normal olan 1231 meme lobundan 574’ü (%46,63) CMT pozitif olduğu belirlendi.

Çiftlik altlık yapısı göz önünü alınarak değerlendirme yapıldığında, diğer gruplara kıyasla kauçuk altlık grubunda en düşük oranda mastitisle karşılaşıldığı ve bu grupta tespit edilen CMT pozitiflik değerinin diğer gruplardan düşük ve farkın istatistiki açıdan önemli (p<0.001) olduğu tespit edildi (Tablo 1). Meme körlüğü bakımından altlık grupları arasındaki farklılık istatistik açıdan önemsiz bulundu.

**Tablo 1.** İneklerin buldukları işletmenin altlık yapısına göre CMT test sonuçları.

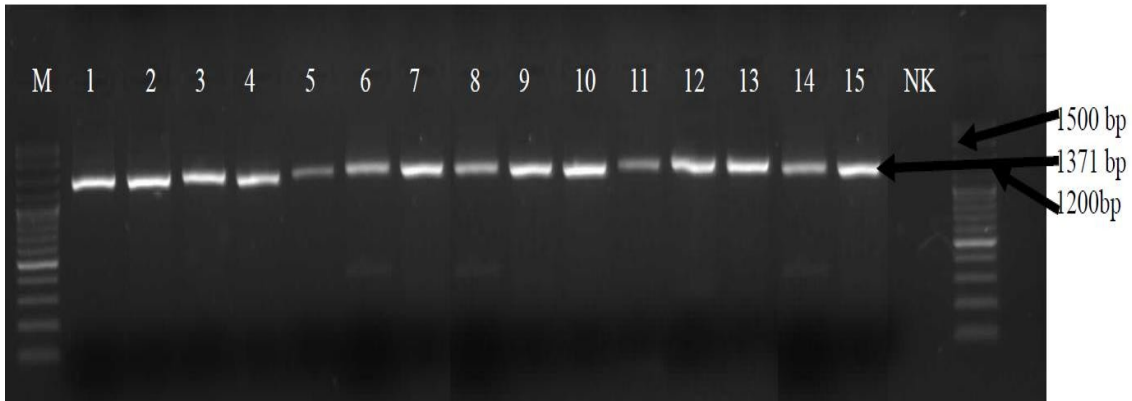
Altılık	BAŞ				Toplam	MEME LOBU				Toplam
	CMT(+)		CMT(-)			CMT(+)		CMT(-)		
Yapısı	n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
Gübre	173 <sup>a</sup>	80,47	42 <sup>a</sup>	19,53	215	459 <sup>a</sup>	54,38	385 <sup>a</sup>	45,61	844
Kauçuk	26 <sup>b</sup>	41,27	37 <sup>b</sup>	58,73	63	54 <sup>b</sup>	21,51	197 <sup>b</sup>	78,49	251
Beton	27 <sup>a</sup>	79,41	7 <sup>a</sup>	20,59	34	61 <sup>a</sup>	44,85	75 <sup>a</sup>	55,15	136
<b>Genel</b>	<b>226</b>	<b>72,43</b>	<b>86</b>	<b>27,57</b>	<b>312</b>	<b>574</b>	<b>46,62</b>	<b>657</b>	<b>53,37</b>	<b>1231</b>
<b>X<sup>2</sup></b>										
<b>P</b>										

\*: P<0,05, a, b: Aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki farklılık istatistik açıdan önemlidir (p<0,05). Toplamda incelenen 312 hayvanın bazılarında meme lobları kör (toplam 17 meme lobu) olduğu için toplam incelenen meme lobu sayısı beklendiği gibi 1248 yerine 1231 olmuştur.

**Mikrobiyolojik Bulgular:** Yapılan PZR'da, 128 izolat için 16S üniversal primerleri kullanılarak 1371 bp uzunluğunda bantlar elde edildi (Resim 1).

Hayvan başı birer numune olmak üzere seçilen 226 numunedan, mikrobiyolojik ekim sonrasında 128'inde (%56,64) üreme (izolat) tespit edilirken, 98'inde (%43,36) üreme tespit edilemedi.

Mikrobiyolojik izolasyon ve identifikasyon sonucu 128 süttten 178 mikroorganizma ürettiği (Tablo 2), bunlardan 176'sının (45 farklı) bakterisi, ikisinin maya olmak üzere, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. ve koliform grubu bakterilerin en çok identifiye edilen türler olduğu belirlendi.



**Resim 1.** 16S üniversal primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR M: Marker (100 bp DNA Ladder) 1-14: Saha izolatları, 15: Pozitif Kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212). NK: Negatif Kontrol (DNA'sız mastermiks).

Moleküler identifikasyon sonucu, 176 adet bakterinin 77 (%43,75) adeti bulaşıcı mastitis, 99 (%56,25) adeti çevresel mastitis etkeni olarak belirlendi ve çiftlik yapısına göre dağılım Tablo 3'te verildi. Bulaşıcı mastitis etkenleri içerisinde *Corynebacterium* spp. 32 (%17,97), Koagülaz Negatif Stafilokoklar (KNS) 26 (%11,2), *S. agalactiae* 12 (%6,74), *S. aureus* 7 (%3,93) olarak tespit edildi. Belirlenen otuz iki *Corynebacterium* spp.'nin %87,5'i (n=28) serbest gezintili ve gübrenin yataklık olarak kullanıldığı işletmelerde, %6,2'i (n=2) serbest gezintili ve kauçuk yataklığın kullanıldığı işletmede,

%6,2'i (n=2) ise beton zeminde bağlı şekilde bakılarak hayvancılık yapan işletmelerde görüldü. İzolasyonu yapılan 29 *S. uberis*'in (9 işletmede *Corynebacterium* türü bakteriler ile birlikte) %93,1 (n=27) serbest gezintili ve gübrenin yataklık olarak kullanıldığı işletmelerde, %6,9'u (n=2) beton zeminde bağlı şekilde bakılarak hayvancılık yapılan işletmelerde saptandı. İzole edilen bulaşıcı mastitis etkeni olan 12 *S. agalactiae*'nin tümü serbest gezintili ve gübrenin yataklık olarak kullanıldığı bir işletmede belirlendi.

**Tablo 2.** İzole edilen bakteriler.

İzole edilen patojenler	N	%	İzole edilen patojenler	N	%
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	14	7,87	<i>Rhodococcus sp.</i>	3	1,69
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	3,93	<i>Lactococcus lactis</i>	4	2,25
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	6	3,37	<i>Aerococcus viridans</i>	4	2,25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	2,25	<i>Brevibacterium paucivorans</i>	1	0,56
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	0,56	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	2	1,12
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1	0,56	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	1	0,56
<i>Streptococcus uberis</i>	29	16,29	<i>Micrococcus aloeverae</i>	1	0,56
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12	6,74	<i>Kocuria salsicia</i>	1	0,56
<i>Streptococcus parauberis</i>	6	3,37	<i>Trueperella pyogenes</i>	1	0,56
<i>Streptococcus hongkongensis(uberis)</i>	4	2,25	<i>Escherchia coli</i>	3	1,69
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2	1,12	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0,56
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	1,12	<i>Enterobacter cloacea</i>	1	0,56
<i>Corynebacterium sp.</i>	32	17,97	<i>Shigella flexneri</i>	1	0,56
<i>Bacillus licheniformis</i>	7	3,93	<i>Acinetobacter iwoffi</i>	3	1,69
<i>Bacillus pumilis</i>	3	1,7	<i>Hafnia paralvei</i>	2	1,12
<i>Bacillus subtilis</i>	2	1,69	<i>Pasteurella multocida</i>	1	0,56
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	0,56	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0,56
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	3,4	<i>Pseudomonas spp.</i>	1	0,56
<i>Enterococcus faecium</i>	1	0,56	<i>Pseudocitrobacter spp.</i>	1	0,56
<i>Enterococcus durans</i>	1	0,56	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0,56
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	0,56	<i>Candida spp.</i>	2	1,1

**Tablo 3.** İzole edilen etkenlerin altlık gruplarına göre dağılımı.

Altlık Yapısı	Etken		Genel
	Çevresel	Bulaşıcı	
<b>Gübre</b>	71	63	134
<b>Kauçuk</b>	6	3	9
<b>Beton</b>	22	11	33
<b>Genel</b>	99	77	176
<b>kikare</b>	1,064		
<b>P</b>	Ö.D.		

### Tartışma ve Sonuç

Süt inekçiliğinde sık olarak karşılaşılan mastitis, özellikle de subklinik mastitis ülkemiz hayvancılığında önemli ekonomik kayıplara sebep olmakta ve ülkemizin farklı yörelerinde farklı oranlarda görülmektedir. Yapılan çalışmalarda CMT ile meme lobu ve hayvan bazında tespit edilen subklinik mastitis oranları, sırasıyla; %7,4-60,2 ve %24-73,8 arasında değiştiği belirlenmiştir (Acar ve ark, 2012; Kaşıkçı ve ark, 2012; Özenç, 2019;

Rişvanlı ve Kalkan, 2001; Sağlam ve ark, 2018; Saydan ve Kalkan, 2017; Tel ve ark, 2009). Sunulan çalışmada meme lobu bazında subklinik mastitis oranı %46,6, hayvan bazında ise %72,4 olarak tespit edildi. Hayvan bazında CMT pozitiflik oranı, yapılan çalışmalardaki oranlar arasında kaldığı, fakat yüksek oranlara (Akdağ ve ark, 2017; Çokal ve Konuş, 2012; Ergün ve ark, 2004; Özenç, 2019; Tel ve ark, 2009) daha yakın olduğu belirlendi. Subklinik mastitis prevalansının yüksek oranda tespit edilmesi, aile tipi ve 10-50 sağmal kapasiteli işletmelerde, Özenç ve

ark. (2019) ile Yeşilmen ve arkadaşlarının (2012) da belirttiği gibi subklinik mastitise karşı korunma tedbirlerinin tam bilinmemesi ya da uygulanmaması şeklinde yorumlandı.

Subklinik mastitisler düzenli kontrolleri ve koruma uygulamaları yapılmadığı zaman ilerleyerek klinik mastitis şekillenebilir. Klinik mastitis olgularında meme dokusuna erken ve doğru bir tedavi yapılmadığında enfekte meme lobu süt üretim özelliğini kaybeder ve meme körelir. Ülkemizde yapılan mastitis ile ilgili çalışmalarda (Koçyiğit ve ark, 2016; Özdemir ve Kaymaz, 2013; Özenç, 2019; Saydan ve Kalkan, 2017), kör meme lobu oranının %0,78-4,84 arasında olduğu görülmüştür. Subklinik mastitis prevalansının belirlenmesi için yapılan bu çalışmada kör meme lobu oranı %1,36 olarak bulundu. Bu oran ülkemizde yapılan daha önceki çalışmalarda elde edilen değerler ile uyumlu olduğu görüldü. On yedi adet kör meme lobunun 16'sı (%94,12), altlık olarak gübre kullanılan ve sağım hijyenine dikkat edilmeyen işletmelerde tespit edildi.

Ahır ve barınağa bağlı faktörler de mastitise duyarlılığı artırır, özellikle ineklerin ayrı bağlandığı ve yeterli genişlikte alana sahip olmaması durumlarında ineklerde stres meydana gelir. Hayvanların yatıp kalkma sırasında birbirlerinin memesine basabilir ve meme yaralanmaları ile mastitise duyarlılık artar. Altlık olarak nemli gübre, talaş, saman gibi organik maddeler bakterilerin barınma ve üremeleri için uygun ortamlardır. Bundan dolayı önerilen altlıklar nem oranı düşük, içinde bakterilerin kullanabileceği besin maddesi az ve inorganik yapılı olmalıdır (Baştan, 2019). Altlık yapısının CMT sonuçları üzerinde etkisi değerlendirildiğinde Tablo 1'de belirtildiği üzere, kauçuk altlık grubunda bulunan ineklerde CMT+ oranının önemli derecede düşük olduğu görüldü ( $P<0.001$ ). Yapılan çalışmada kullanılan altlıklardan, kauçuk altlığın meme sağlığı açısından tercih edilebilir olduğunu göstermiştir.

Subklinik mastitise sebep olan mikroorganizmaların tanısı için yapılan incelemelerin hepsinde bakteriyel üremeye rastlanılmamaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda (Çokal ve Konuş, 2012; Ergün ve ark, 2004; Gürtürk ve ark, 1998; Koçyiğit ve ark, 2016; Sağlam ve ark, 2018; Tel ve ark, 2009; Yeşilmen ve ark, 2012) CMT pozitif ineklerde üremenin tespit edilmediği oran %10,82-39,20 olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada 312 inekten CMT pozitif sonuç veren 226 ineğin 98'inde (%43,36) üreme tespit edilemedi. Bu oran ülkemizde rastlanan oranların üzerinde olduğu ve sebebinin çalışmanın yapılma zamanının süt ineği işletmelerinin ani rasyon değişikliği yaptığı zamana denk gelmesi ve düşük konsantrasyonlu meme

patojenleri (Wellenberg ve ark. 2002) olabileceği kanaatine varıldı.

Bulaşıcı mastitis etkenleri olan *S. aureus*, *S. agalactiae*, *C. bovis*, KNS ve *Mycoplasma* türlerinin en önemli kaynağı enfekte meme lobları, yetersiz sağım hijyeni, sağımda kullanılan kontamine ekipman ve sağım makinelerinde gözlenen sorunlardır. Sürü içerisinde inekten ineğe yayılım gösterir, genellikle meme paranzim dokusuna ve süt toplama kanallarına yerleşerek kronik mastitise yol açar ve sürü için devamlı bir mastitis kaynağı oluştururlar. Bu mikroorganizmalar memenin saprofitidir. Genel olarak bulaşıcı mastitis etkenlerine; %22,9-81,24 oranları arasında rastlanılmaktadır (Baştan ve ark, 2015; Beytut ve ark, 2002; Çokal ve Konuş, 2012; Ergün ve ark, 2004; Sağlam ve ark, 2018; Tel ve ark, 2009; Türkyılmaz ve ark. 2010; Yeşilmen ve ark, 2012). Sunulan çalışmada 77 (%43,75) adet bulaşıcı mastitis etkeni tespit edildi. Tespit edilen bu oranın, ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda belirlenen oranlar ile uyumlu olduğu belirlendi.

Koagülaz negatif stafilkokların prevalansı %8,33-44,83 olarak belirlenmiştir. (Baştan ve ark, 2015; Beytut ve ark, 2002; Büyükcangaz ve ark, 2012; Çokal ve Konuş, 2012; Ergün ve ark, 2004; Hadımlı ve ark, 2013; Koçyiğit ve ark, 2016; Macun ve ark, 2011; Sağlam ve ark, 2018; Tel ve ark, 2009). Bulunduğu sürüde çiftlik yönetimi iyi değil ise hızlı yayılım özelliği gösteren ve önemli ölçüde süt kaybına yol açan *S. agalactiae*'nin oranını Ergün ve ark (2004) %3,5, Acar ve ark (2012) %5,88, Beytut ve ark (2002) ise %9,37 olarak belirtmişlerdir. Bulaşıcı mastitis etkenleri arasında yer alan *Corynebacterium* spp.'nin görülme oranı %0,3-2,35 arasında değişmektedir (Baştan ve ark, 2015; Sağlam ve ark, 2018). Cins bazında incelendiğinde ise Tel ve ark (2009) *C. bovis*'i %3,1, Beytut ve ark (2002) *C. pyogenes*'i %19,79 oranında bulunduğunu ifade etmişlerdir. Yapılan çalışmada ise bulaşıcı mastitis etkenleri içerisinde en sık *Corynebacterium* türleri 32 (%17,98) ve sırasıyla KNS 26 (%14,61), *S. agalactiae* 12 (%6,74), *S. aureus* 7 (%3,93) adet tespit edildi.

Çevresel mastitis etkenlerinin %16,68-77,1 oranları arasında bulunduğu (Beytut ve ark, 2002; Ergün ve ark, 2004; Koçyiğit ve ark, 2016; Türkyılmaz ve ark. 2010) ve tespit edilen %56,25 oranın, diğer çalışmalarda elde edilen değerler arasında kaldığı görüldü. Subklinik mastitis ile ilgili kaynaklarda koliform bakterilerin en önemlisi *E. coli*'dir ve tespit edilme oranı %2,2-28,9 arasında değişir (Baştan ve ark, 2015; Beytut ve ark, 2002; Büyükcangaz ve ark, 2012; Çokal ve Konuş, 2012; Ergün ve ark, 2004; Koçyiğit ve ark, 2016; Özdikmenli Tepeli ve Zorba, 2017; Sağlam ve ark, 2018; Tel ve ark, 2009). Sunulan çalışmada *E. coli*

%1,69 oranında tespit edildi. Bu oran bazı çalışmalarda (Baştan ve ark, 2015; Ergün ve ark, 2004) orana yakın (%2,2 -2,73) olmakla birlikte ve ülkemizde subklinik mastitis ile ilgili bulunan oranların çok altında kaldığı görüldü. Mastitise neden olan bakteriler, yöresel olarak farklılıklar gösterebilmektedir. Bu farklılığa, her yöredeki çevresel bakteri florasındaki farklılıklar, çalışmalarda kullanılan izolasyon yöntemlerindeki farklılıklar hatta yörelerde mastitis tedavisinde kullanılan farklı yöntemler sebep olabilir. Tablo 3'de verilen değerler incelendiğinde çevresel mastitis etkenleri, altlık olarak gübrenin kullanıldığı işletmelerde daha yüksek oranda belirlendi.

Sonuç olarak, subklinik mastitis olguları süt ineği yetiştiriciliği yapan işletmeler için tehdit olmaya devam etmektedir. Mastitis vakalarının kontrol edilebilmesinde, mastitise neden olan patojenlerin doğru bir şekilde tanımlanması esastır. Bu çalışmada, etiyolojik etkenlerin kısa sürede ve doğru bir şekilde tanımlanmasında sekans analizi yöntemi uygulanmıştır. Veteriner teşhis laboratuvarlarında bakterilerin tanımlanması için sekans analizi yöntemi, maliyetlerinin düşmesi ve teknik personelin bilgisinin artması sonucunda, geleneksel fenotipik tanımlama yöntemlerinin yerini alacak gibi görünmektedir.

## Kaynaklar

- Acar G, Yılmaz E, Solmaz H, Cantekin Z, 2012: Hatay bölgesinde klinik ve subklinik mastitisli ineklerden *Streptococcus* spp. etkenlerinin izolasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *AVKAE Dergisi*, 2 (2), 1-5.
- Akdağ F, Gürler H, Teke B, Uğurlu M, Koçak Ö, 2017: Jersey ırkı ineklerde CMT skorlarının ve skorların değerlendirilmesinde farklılığın süt verimi, süt bileşimi ve subklinik mastitis tanısına etkisi. *JIVS*, 43 (1), 44-51.
- Awale MM, Dudhatra GB, Avinash K, Chauhan BN, Kamani DR, Modi CM, Patel HB, Mody SK, O'Kennedy R, 2012: Bovine Mastitis: A Threat to Economy. *Open Access Scientific Reports*, 1, 295.
- Baştan A, Salar S, Cengiz M, Darbaz İ, Demirel MA, Özen D, 2015: The prediction of the prevalence and risk factors for subclinical heifer mastitis in Turkish dairy farms. *Turk J Vet Anim Sci*, 39, 682-687.
- Baştan A, 2019: İneklerde Meme Sağlığı ve Sorunları 3. Baskı. Neyir Matbaacılık Tanıtım Hizmetleri, Ankara.
- Beytut E, Aydın F, Özcan K, Genç O, 2002: Kars ili ve yöresinde ineklerde mastitislerin patolojik ve bakteriyolojik olarak incelenmesi. *Kafkas Üniv. Vet Fak Derg*, 8 (2), 111-122.
- Büyükcangaz E, Mat B, Khider ABD Alrahim Ahmed M, 2012: Subklinik mastitisli sığır sütlerinin mikrobiyolojik analizi ve izolatların antimikrobiyal direnç profili. *Uludağ Univ J Fac Vet Med*, 31 (2), 35-44.
- Çokal Y, Konoş R, 2012: Subklinik mastitisli ineklerin sütlerinden aerobik bakterilerin izolasyonu. *Balıkesir Sağlık Bil Derg*, 2012, 1 (2), 65-69.
- Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC, 1989: Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 17 (19), 7843-53.
- Ergün Y, Aslantaş Ö, Doğruer G, Cantekin Z, 2004: Hatay ilindeki aile tipi süt sığırcılığı işletmelerinde subklinik mastitislerin epidemiyolojisi. *Eurasian J Vet. Sci*, 20 (4), 25-28.
- Guimaraes JL, Brito MA, Lange CC, Silva MR, Ribeiro JB, Mendonça LC, 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.
- Gürtürk K, Boynukara B, Ekin İH, Gülhan T, 1998: Van ve yöresindeki ineklerde subklinik mastitisin etiyolojisi üzerine bir çalışma. *YYÜ Vet Fak Derg* 9 (1-2), 1-4.
- Hadimli HH, Sayın Z, Erganiş O, Kav K, Sakmanoğlu A, 2013: Subklinik mastitisli süt ineklerinden izole edilen koagülaz negatif stafilocokların identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Eurasian J Vet Sci*, 30 (1), 14-19.
- Hertl JA, Schukken YH, Tauer LW, Welcome FL, Gröhn YT, 2018: Does clinical mastitis in the first 100 days of lactation predict increased mastitis occurrence and shorter herd life in dairy cows? *J Dairy Sci*, 101, 2309-2323.
- Hortet P, Seegers H, 1998: Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Prev Vet Med*, 37(1-4), 1-20.
- Kaşıkçı G, Çetin Ö, Bingöl EB, Gündüz MC, 2012: Relations between electrical conductivity, somatic cell count, California mastitis test and some quality parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *Turk J Vet Anim Sci*, 36 (1), 49-55.
- Keskin, A, 2015: Sürülerde mastitis kontrol stratejileri, In: Sığırlarda sürü sağlığı ve yönetimi Batmaz H (Ed), 1. Baskı, 335-378, Alfa Akademi, Bursa.
- Koçyiğit R, Yılmaz O, Özenc E, Uçar M, 2016: Effect of some risk factors on subclinical mastitis in dairy cows. *Kocatepe Vet J*, 9 (3), 185-193.
- Lucey S, Rowlands GJ, Russel AM, 1986: Short-term associations between disease and milk yield of dairy cows. *J Dairy Res*, 53, 7-15.
- Macun HC, Pir Yağcı İ, Ünal N, Kalender H, Sakarya F, Yıldırım M, 2011: Kırıkkale'de belirlenen subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve antibiyotik direnç durumu. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 8 (2), 83-89.
- Mtaallah B, Oubey Z, Hammami H, 2002: Assessment of milk yield losses and subclinical mastitis risk factors using bulk milk somatic cell counts in dairy herds. *Rev Med Vet*, 153 (4), 251-260.
- Özdemir S, Kaymaz M, 2013: Küçük aile işletmelerinde yetiştirilen ineklerde subklinik mastitis insidensi ve tanı yöntemlerinin karşılaştırılması. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 8 (1), 71-79.
- Özdikmenli Tepeli S, Zorba NN, 2017: Çanakkale (Yenice) ilinde üretilen çiğ sütlerin bazı özellikleri ve subklinik

- mastitis görülme oranı. *Trakya Univ J Natural Sci*, 18 (1), 41-47.
- Özenç E, 2019: Determination of risk factors associated with subclinical mastitis as detected by california mastitis test in smallholder dairy farms in Afyonkarahisar. *Kocatepe Vet J*, 12 (3), 277-283.
- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Fliz Patrick ES, Fanning S, Hartigan PJ, 2011: Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Second Edition, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.
- Rişvanlı A, Kalkan C, 2001: Elazığ bölgesi süt ineklerinde klinik ve subklinik mastitislerin dağılımı, mastitislere sebep olan mikroorganizmaların izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine çalışma. Süt İnekçiliğinde Mastitis Sempozyumu, Burdur 04-05 Mayıs, *Akdeniz Üniversitesi Veteriner Fakültesi*, Yayın No: 2, 59-67.
- Sağlam AG, Otlu S, Çoşkun MR, Çelik E, Büyük F, Şahin M, 2018: Prevalence of subclinical mastitis in cows, isolation of agents and determination of their antibiotic susceptibility. *Eurasian J Vet Sci*, 34 (2), 92-98.
- Saydan M, Kalkan C, 2017: Malatya Arguvan yöresinde süt ineklerinde subklinik mastitis prevalansı. *Fırat Üniv Sağlık Bil Derg (Vet)*, 31 (3), 193 - 200.
- Schepers JA, Dijkhuizen AA, 1991: The economics of mastitis and mastitis control in dairy cattle; A critical analyses of estimates published since 1970. *Prev Vet Med*, 10 (3), 213-224.
- Taponen S, Liski E, Heikkilä AM, Pyörala 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.
- Tel OY, Keskin O, Zonturlu AK, Arsenim Kaya NB, 2009: Şanlıurfa yöresinde subklinik mastitis görülme oranı, aerobik bakteri izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *Fırat Üniv Sağlık Bil Derg (Vet)*, 23 (2), 101-106.
- TUİK,2019:[http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1002](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002), Erişim tarihi;15.12.2019.
- Türkyılmaz S, Yıldız Ö, Oryaşın E, Kaynarca S, Bozdoğan B, 2010: Molecular identification of bacteria isolated from dairy herds with mastitis. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (6), 1025-1032.
- Viguié C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O'Kennedy R, 2009: Mastitis detection: Current trends and future perspectives. *J Biotechnol*, 27, 486-493.
- Vural R, Ergün Y, Özenç E, 2016: Büyük ruminantlarda mastitis, In: Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları. Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A. (Ed), 1. Baskı, 149-259, Medipres, Malatya.
- Wellenberg GJ, van der Poel WHM, Van Oirschot JT, 2002: Viral infections and bovine mastitis: A review. *Vet Microbiol*, 88, 27-45.
- Wolfova M, Stipkova M, Wolf, J, 2006: Incidence and economics of clinical mastitis in five Holstein herds in the Czech Republic. *Prev Vet Med*, 77 (1-2), 48-64.
- Yeşilmen S, Özyurtlu N, Bademkiran S, 2012: Diyarbakır yöresinde subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1 (4), 24-29.
- Zheng D, Alm EW, Stahl DA, Raskin L, 1996: Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Appl Environ Microb*, 62 (12), 4504-13.
- \*: "Aydın İli Söke İlçesinde Siyah-Alaca Sütçü İneklerde Subklinik Mastitis Prevalansının Belirlenmesi" adlı Yüksek Lisans tezinden özetlenmiş, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (VTF-18036) desteklenmiştir.
- \*\***Yazışma Adresi:** Hayrettin ÇETİN  
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Işıklı, Efeler, Aydın.  
**e-mail:** hcetin@adu.edu.tr



## Yüksek Çevre Sıcaklığında Yetiştirilen Etlik Piliçlerde İçme Suyu Sıcaklığının ve Yerleşim Sıklığının Bazı Refah Parametreleri Üzerine Etkisi

Mehmet KAYA<sup>1,a,\*</sup>, Evrim DERELİ FİDAN<sup>1,b</sup>

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye.  
<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-2377-4474, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-9805-6162

Geliş Tarihi: 15.04.2021

Kabul Tarihi: 09.10.2021

**Özet:** Bu çalışmada, yüksek çevre sıcaklığında yetiştirilen etlik piliçlerin içme suyu soğutulması ve farklı yerleşim sıklıklarının bazı refah parametreleri, hareketsizlik süresi ve heterofil/lenfosit oranı üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Araştırmada, içme suyu sıcaklığına (10°C ve 31°C) göre iki grup, yerleşim sıklığına (12, 15 ve 18 piliç/m<sup>2</sup>) göre üç grup ve her grupta dört tekrar grubu olmak üzere toplam 360 adet etlik piliç kullanılmıştır. Araştırmada etlik piliçlerde ayak taban ve tarsal bölge yangısı ile tüy kirliliği özellikleri üzerine içme suyu sıcaklığı ve yerleşim sıklığının etkisi önemsiz bulunmuştur. Yürüme skoru üzerine içme suyu sıcaklığı bakımından gruplar arasındaki fark önemli (P<0,001) bulunurken, yerleşim sıklığının etkisi önemsiz bulunmuştur. İçme suyu sıcaklığının tüy zararı skoruna etkisi sırt bölgesinde önemsiz bulunurken; but, kanat ve kuyruk bölgelerinde önemli düzeyde (P<0,001) fark olduğu belirlenmiştir. Yerleşim sıklığının but, kanat, kuyruk ve sırt bölgelerindeki tüy zararı skoruna etkisi önemsiz bulunmuştur. Hareketsizlik süresi ve heterofil/lenfosit oranı üzerine içme suyu sıcaklığının etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunurken, yerleşim sıklığının etkisi önemli (P<0,05) bulunmuştur. Araştırma sonunda, soğuk içme suyu uygulamasının yürüme ve tüy zararı skoru gibi refah parametrelerinde etkisinin önemli olduğu gözlemlenmiştir. Yerleşim sıklığının düşük olması, yüksek sıcaklık altında yetiştirilen etlik piliçlerde refah göstergesi olan hareketsizlik süresi ve heterofil/lenfosit oranını düşürdüğü, ancak ayak taban yangısı, tarsal bölge yangısı, tüy kirliliği, yürüme skoru ve tüy zararı skoru bakımından herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Etlik piliç, İçme suyu sıcaklığı, Refah parametreleri, Yerleşim sıklığı.

### The Effect of Drinking Water Temperature and Stocking Density on Some Welfare Parameters of Broilers Reared at High Ambient Temperature

**Abstract:** The present study aimed to determine the effect of drinking water cooling and stocking density of broiler chickens reared at high ambient temperature on some welfare parameters, tonic immobility, and heterophil/lymphocyte ratio. A total of 360 1 day-old male broiler chicks were randomly assigned to groups based on the drinking water temperature (10°C and 31°C) and stocking density (12, 15, and 18 birds/m<sup>2</sup>) with four replicates.

It has been determined that there was not significant difference between drinking water temperature and stocking density on footpad dermatitis, hockburn and feather cleanliness. While the difference between the groups of drinking water temperature was significant (P<0.001), the effect of stocking density was not significant on gait score. While the effect of drinking water temperature was not significant in the back area, there was a significant difference (P<0.001) in the thigh, wing and tail regions; the effect of stocking density on the feather damage in the thigh, wing, tail, and back regions was insignificant on the feather damage. While the effect of drinking water temperature was not significant, the effect of stocking density was significant on tonic immobility and heterophil/lymphocyte ratio (P<0.05).

In conclusion, it is indicated that a significant effect of cold drinking water on welfare parameters (gait and feather damage); the low stocking density reduces the tonic immobility and H/L ratio on broilers exposed to high temperatures.

**Keywords:** Broiler, drinking water temperature, stocking density, welfare parameters.

### Giriş

Ortam sıcaklığının 22°C'nin üzerine çıktığı durumlarda etlik piliçlerde sıcak stresinin etkileri görülmeye başlar. Sıcak stresine maruz kalan etlik piliçler vücut sıcaklıklarının düşmesi için davranışsal tepkiler gösterir. Etlik piliçler su tüketimi, vücut yüzey alanı ve solunum hızını artırarak; yem tüketimi, metabolizma hızı ve aktiviteyi azaltarak ortama adapte olmaya çalışırlar (Erensayın, 2000).

Etlik piliçlerde sıcaklık stresinin azaltılması üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Araştırmacılar

yem bileşimi (Park ve ark., 2013), aydınlatma programı (Yoon ve ark., 2013), yerleşim sıklığı (Uzum ve Toplu, 2013) ve soğuk içme suyu (Bruno ve ark., 2011) gibi uygulamaların sıcaklık stresini azalttığına dair sonuçlar elde etmişlerdir.

Yüksek çevre sıcaklığında yetiştirilen kanatlılarda soğuk içme suyu tüketimi sıcak stresle başa çıkabilmeyi sağlar, performansı artırır; vücut ısısını, solunum hızını ve ölüm oranını düşürür (Bruno ve ark., 2011). Park ve ark. (2013) etlik

piliçlerde yaptıkları çalışmada içme suyunun 9°C'ye soğutulması verilmesinin hayvanların verim performanslarını olumlu yönde etkilediğini ortaya koymuşlardır.

Yüksek yerleşim sıklığı altında yetiştirilen etlik piliçlerde verim düşüklüğü, sağlık problemleri, olumsuz refah koşulları ve kanibalizm gibi problemler ortaya çıkar (Türkyılmaz, 2008). Etlik piliçlerde 30 kg/m<sup>2</sup>'nin üzerindeki yerleşim sıklığı büyüme hızının azalması, yürüme bozukluğu ve canlı ağırlığın düşmesi ile ilişkilendirilmiştir (Dozier ve ark., 2006). Onbaşılar ve ark. (2008) yerleşim sıklığının yüksek olmasının tonik immobilité süresi ve heterofil-lenfosit oranını istatistiksel olarak önemli düzeyde artırdığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, yüksek çevre sıcaklığında yetiştirilen etlik piliçlerin içme suyu soğutulması ve farklı yerleşim sıklıklarının bazı refah parametreleri (ayak tabanı yangısı, tarsal bölge yangısı, tüy kirliliği, yürüme skoru, tüy zararı skoru), hareketsizlik süresi ve heterofil/lenfosit (H/L) oranı üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

## Materyal ve Metot

Araştırma, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kanatlı Araştırma Birimi'nde 42 gün süreyle yürütülmüştür. Çalışmanın yürütülmesi için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (09.07.2020 tarih ve 64583101/2020/040 sayılı) izin alınmıştır.

**DeneySEL Tasarım:** Araştırmada özel bir kuluçkahaneden alınan, bir günlük yaşta toplam 360 adet erkek ticari etlik civciv (Ross 308) kullanılmıştır. Kullanılan civcivler içme suyu sıcaklığına (10°C ve 31°C) göre iki grup, yerleşim sıklığına (12, 15 ve 18 piliç/m<sup>2</sup>) göre üç grup olmak üzere 2x3 deneme desenine uygun olacak şekilde iki odaya rastgele yerleştirilmiştir. Her bir grup için dört tekrar grubu düzenlenmiştir.

Etlik piliçler, benzer özelliklere sahip her iki odada aynı sayıda ve konumda dairesel yemlik, nipelli suluk ve otomatik ısıtıcı bulunan odun talaşı altlıklı yer bölmelerinde yetiştirilmiştir.

**Bakım ve Besleme:** Araştırmada hayvan refahı konusu dikkate alınarak tüm gruplarda ilk yedi gün ve kesimden önceki üç gün maksimum aydınlatma programı, diğer günlerde ise 18 saat aydınlık-6 saat karanlık (karanlık uygulamasının 4 saati kesintisiz, geriye kalan 2 saati ise 30 dakika aydınlık, 30 dakika karanlık şeklinde yapılmıştır) aydınlatma programı uygulanmıştır (EU, 2007). Yaz mevsiminde (Haziran-Temmuz ayları) yürütülen çalışma boyunca sıcaklık ve nem düzeyleri termometre ve higrometre ile günlük olarak kaydedilmiştir. İçme suyu sıcaklığı ölçümleri de günde iki kez yapılmıştır. Etlik piliç yetiştirme sıcaklığı ilk 3 gün 34°C'ye ayarlanmış,

kesime kadar olan sürede de ortalama sıcaklık 31°C olarak ölçülmüştür.

Standart bakım ve besleme uygulanan etlik piliçlere başlangıç, büyütme ve bitirme dönemlerinde verilen besin madde bileşimi Tablo 1'de gösterilmiştir. Etlik piliçlerin yem ve su ihtiyaçları *ad libitum* olarak sağlanmıştır.

**Tablo 1.** Etlik piliçlere verilen besin madde bileşimi.

	Başlangıç (0-10 gün)	Büyütme (11-24 gün)	Bitirme (25-42 gün)
<b>Metabolik Enerji (kcal/kg)</b>	3000	3100	3200
<b>Ham Protein (%)</b>	23	21,5	19,5

Soğuk içme suyu grubunda, nipellerin bağlantılı olduğu soğuk su borularında sıcaklığın 10°C'de sabit tutulabilmesi için daha önceden bu iş için tasarlanmış ve dakikada 5 L su kapasiteli bir soğutucu cihaz kullanılmıştır (Cihso 2000, 2.5 hp, Türkiye). İçme suyunun sıcaklığını her an izleyebilmek için su giriş ve çıkışlarına termometre düzenekleri yerleştirilmiş ve akış kontrol düzenekleriyle su borularından dakikada 400 ml suyun geçmesi sağlanmıştır.

**Veri Toplama:** Araştırmanın 41. gününde her tekrar grubundan rastgele seçilen 5 piliç (toplam 120 piliç) hareketsizlik süresi testi için kullanılmıştır. Çalışmanın sonunda (42. gün) hareketsizlik süresi testi uygulamasına alınmayan piliçlerden 120 tanesi rastgele seçilerek (her tekrar grubundan 5 piliç) ayak tabanı ve tarsal bölge yangısı, tüy kirliliği, yürüme skoru, tüy zararı skoru ve H/L oranı bakımından değerlendirilmiştir. Ayrıca 42. günde kesim ağırlığını belirlemek için tüm piliçler bireysel olarak tartılmıştır.

Ayak taban yangısında tabanda herhangi bir lezyon yok ise 0; taban yastığında küçük yüzeysel bir lezyon var ise 1; lezyon şiddetli ve taban yastığının büyük bir kısmını kaplıyor ise 2 puan olarak değerlendirilmiştir (Bilgili ve ark., 2006). Tarsal bölge yangısında ise tarsal eklem bölgesinde lezyon yok ise 0; renk değişimi veya küçük bir lezyon var ise 1; lezyon büyük ve kabuklanma var ise 2 ile puanlanmıştır (RSPCA, 2017). Tüy kirlilik düzeyi göğüs ve sırt bölgesinde bulunan tüyler çok temizse 0; orta düzeyde kirli ise 1; çok kirli ise 2 puan olarak belirlenmiştir (Welfare Quality, 2009).

Yürüme skorlamasında yürüyüş normal ise 0; tam anlaşılabilen hafif anormallikler varsa 1; hafif topallık hayvanın hareket etmesine ve yem yemesine engel teşkil etmiyorsa 2; topallık hayvanın rahat hareket etmesine engel değilse 3; şiddetli topallık hayvanın zorlanarak yürütülmesine neden

oluyorsa 4; ileri derecede yürüyüş bozukluğu var ve hayvan kanatlarının yardımı ile hareket ediyorsa 5 puan olarak değerlendirilmiştir (Kestin ve ark., 1992).

Tüy zararı skorlamasında sırt, kanat, kuyruk ve but bölgesinde tüyler normale 0; kaba tüylüyse 1; az miktarda tüy kaybı ile birlikte bazı tüylerde kırılma mevcutsa 2; tüy kaybı ile birlikte tüylerin büyük bir kısmında kırılma mevcutsa 3; büyük ölçüde tüy kaybı mevcutsa 4; tüy örtüsü yoksa 5 olarak skorlanmıştır (Kretzschmar-McCluskey ve ark., 2014).

Hareketsizlik süresinde, hayvanlar sessiz ve az ışık alan odada sırt üstü yatırılarak 15 saniye süreyle hareketsiz kalması sonrası kendi kendilerine ayağa kalkana kadar geçen süre ölçülmüştür. Test periyodu içerisinde hayvanların 10 dakikalık süreçte tepki vermedikleri durumlarda ise 600 saniye maksimum skor olarak kabul edilmiştir (Jones ve Faure, 1980).

H/L oranı için, refah değerlendirmeleri ve tartımları yapılan piliçlerin kesim esnasında *vena jugularis*'inden 1 ml kan örneği EDTA'lı tüplere alınmış ve bu örneklerden hazırlanan kan frotileri May-Grünwald Giemsa ile boyandıktan sonra her bir preparatta toplam 100 hücre sayılmıştır (Gross ve Siegel, 1983).

### İstatistik Analizler

Verilerin istatistik değerlendirmesi SPSS 22.0 istatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hareketsizlik süresi ve H/L oranı bakımından faktörlerin etki durumlarını ortaya koymak için Genel Doğrusal Model (GLM) yöntemi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıkların önem kontrolü ise Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir (Duncan, 1955). Ayak tabanı yangısı

derecelendirmesi sonucu tüm piliçlerin "0" skoruna sahip olması neticesinde herhangi bir istatistiksel analiz yöntemi kullanılamamıştır. Skorumla yoluyla belirlenen parametrelerin (yürüme skoru, tarsal bölge yangısı ve tüy zararı skoru) analizinde Yates düzeltmeli Ki-Kare ( $X^2$ ) testi uygulanmıştır.  $P < 0,05$  olduğunda istatistiksel anlamlılık göz önünde tutulmuştur (Özdamar, 2004).

### Bulgular

Araştırmada, 8-42. günler arasındaki kümes içi ortalama sıcaklık 31,6°C (min-maks: 27,4-33,3°C), ortalama nem %55,9 (min-maks: 50,1-61,4) düzeyinde tespit edilmiştir.

Araştırmada kesim ağırlığı bakımından soğuk içme suyu grubu (1912 g) ile normal içme suyu grubu (1916 g) arasında önemli bir farkın olmadığı görülmüştür. Yerleşim sıklığı bakımından metrekarede 12 piliç yetiştirilen gruptaki kesim ağırlığının (2027 g), metrekarede 15 ve 18 piliç yetiştirilen gruplara (1891 ve 1824 g) göre önemli düzeyde ( $P < 0,001$ ) yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmada, ayak tabanı yangısı skorlaması yapılan tüm etlik piliçlerde sadece skor 0'ın görüldüğü, skor 1 ve 2'nin görülmediği tespit edilmiştir. Normal ve soğuk içme suyu gruplarında, tarsal bölge yangısı görülme sıklığı skor 0'da sırasıyla %91,7 ve %93,3 oranlarında bulunmuştur. Tarsal bölge yangısı bakımından su sıcaklığı ve yerleşim sıklığı grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Normal ve soğuk içme suyu gruplarında tüy kirliliği görülme oranı skor 0'da sırasıyla %63,3 ve %48,3 olarak tespit edilmiştir. İçme suyu sıcaklığı ve yerleşim sıklığının tüy kirliliği üzerine etkisinin önemsiz olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

**Tablo 2.** İçme suyu sıcaklığı ve yerleşim sıklığının tarsal bölge yangısı ve tüy kirliliği üzerine etkisi.

Faktör	n	S: 0	n	S: 1	n	S: 2	$X^2$	P
<b>Tarsal Bölge Yangısı (%)</b>								
<i>Su Sıcaklığı</i>								
Normal	55	91,7	5	8,3	0	-	0,120	0,729
Soğuk	56	93,3	4	6,7	0	-		
<i>Yerleşim Sıklığı</i>								
12 piliç/m <sup>2</sup>	36	90,0	4	10,0	0	-	5,045	0,080
15 piliç/m <sup>2</sup>	35	87,5	5	12,5	0	-		
18 piliç/m <sup>2</sup>	40	100,0	0	0,0	0	-		
<b>Tüy Kirliliği (%)</b>								
<i>Su Sıcaklığı</i>								
Normal	38	63,3	22	36,7	0	0,0	4,929	0,085
Soğuk	29	48,3	28	46,7	3	5,0		
<i>Yerleşim Sıklığı</i>								
12 piliç/m <sup>2</sup>	24	60,0	15	37,5	1	2,5		
15 piliç/m <sup>2</sup>	22	55,0	16	40,0	2	5,0	2,729	0,604
18 piliç/m <sup>2</sup>	21	52,5	19	47,5	0	0,0		

S: Skor;  $X^2$ : Ki-kare değeri

Soğuk içme suyu grubundaki etlik piliçlerin yürüyüşün normal olduğu skor 0'daki oranının (%85), normal içme suyu grubundaki piliçlerin oranından (%30) yüksek ( $P<0,001$ ) olduğu

saptanmıştır. Yürüme skoru üzerine yerleşim sıklığının etkisi önemsiz bulunurken, içme suyu sıcaklığının etkisi ise önemli ( $P<0,001$ ) bulunmuştur (Tablo 3).

**Tablo 3.** İçme suyu sıcaklığı ve yerleşim sıklığının yürüme skoruna etkisi.

Faktör	Yürüme Skoru (%)												$\chi^2$	P
	n	S: 0	n	S: 1	n	S: 2	n	S: 3	n	S: 4	n	S: 5		
<i>Su Sıcaklığı</i>														
Normal	18	30,0	14	23,3	3	5,0	12	20,0	12	20,0	1	1,7	43,419	<0,001
Soğuk	51	85,0	8	13,3	1	1,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0		
<i>Yerleşim Sıklığı</i>														
12 piliç/m <sup>2</sup>	27	67,5	4	10,0	1	2,5	4	10,0	1	2,5	0	0,0	10,937	0,362
15 piliç/m <sup>2</sup>	19	47,5	8	20,0	1	2,5	4	10,0	4	10,0	1	2,5		
18 piliç/m <sup>2</sup>	23	57,5	10	25,0	2	5,0	4	10,0	7	17,5	0	0,0		

S: Skor;  $\chi^2$ : Ki-kare değeri

İçme suyu sıcaklığının tüy zararı skoruna etkisi sırt bölgesinde önemsiz bulunurken but, kanat ve kuyruk bölgelerinde önemli düzeyde ( $P<0,001$ ) fark olduğu belirlenmiştir. Tüy zararı skoru bakımından en iyi sonuç soğuk içme suyu grubunda tespit edilmiştir. Yerleşim sıklığının but, kanat, kuyruk ve

sırt bölgelerindeki tüy zararı skoruna etkisi önemsiz bulunmuştur. 12 piliç/m<sup>2</sup> yerleşim sıklığı grubunda 39 piliçte sırt bölgesinde tüy yapısı normal iken, 1 piliçte kaba tüylü tüy zararı yapısı belirlenmiştir (Tablo 4).

**Tablo 4.** İçme suyu sıcaklığı ve yerleşim sıklığının tüy zararı skoruna etkisi.

Faktör	n	S: 0	n	S: 1	n	S: 2	n	S: 3-5	$\chi^2$	P
	But (%)									
<i>Su Sıcaklığı</i>										
Normal	25	41,7	33	55,0	2	3,3	0	–	39,488	<0,001
Soğuk	57	95,0	3	5,0	0	0,0	0	–		
<i>Yerleşim Sıklığı</i>										
12 piliç/m <sup>2</sup>	31	77,5	8	20,0	0	0,0	0	–	7,301	0,121
15 piliç/m <sup>2</sup>	29	72,5	10	25,0	1	2,5	0	–		
18 piliç/m <sup>2</sup>	22	55,0	18	45,0	1	2,5	0	–		
<i>Kanat (%)</i>										
<i>Su Sıcaklığı</i>										
Normal	33	55,0	26	43,3	1	1,7	0	–	28,440	<0,001
Soğuk	58	96,7	2	3,3	0	0,0	0	–		
<i>Yerleşim Sıklığı</i>										
12 piliç/m <sup>2</sup>	32	80,0	8	20,0	0	0,0	0	–	2,440	0,655
15 piliç/m <sup>2</sup>	30	75,0	10	25,0	0	0,0	0	–		
18 piliç/m <sup>2</sup>	29	72,5	10	25,0	1	2,5	0	–		
<i>Kuyruk (%)</i>										
<i>Su Sıcaklığı</i>										
Normal	22	36,7	33	55,0	5	8,3	0	–	39,774	<0,001
Soğuk	55	91,7	5	8,3	0	0,0	0	–		
<i>Yerleşim Sıklığı</i>										
12 piliç/m <sup>2</sup>	28	70,0	11	27,5	1	2,5	0	–	2,622	0,623
15 piliç/m <sup>2</sup>	25	62,5	12	30,0	3	7,5	0	–		
18 piliç/m <sup>2</sup>	24	60,0	15	37,5	1	2,5	0	–		
<i>Sırt (%)</i>										
<i>Su Sıcaklığı</i>										
Normal	55	91,7	5	8,3	0	–	0	–	0,536	0,464
Soğuk	57	95,0	3	5,0	0	–	0	–		
<i>Yerleşim Sıklığı</i>										
12 piliç/m <sup>2</sup>	39	97,5	1	2,5	0	–	0	–	3,482	0,175
15 piliç/m <sup>2</sup>	38	93,3	2	6,7	0	–	0	–		
18 piliç/m <sup>2</sup>	35	87,5	5	12,5	0	–	0	–		

S: Skor;  $\chi^2$ : Ki-kare değeri

Hareketsizlik süresi ve H/L oranı üzerine yerleşim sıklığının etkisi önemli ( $P<0,05$ ) bulunmuştur. Hareketsizlik süresi ve H/L oranı içme suyu sıcaklığı bakımından soğuk içme suyu

grubunda (sırasıyla 171,06 sn ve 0,63), yerleşim sıklığı bakımından 12 piliç/m<sup>2</sup> olan grupta (177,62 sn ve 0,59) daha düşük düzeyde elde edilmiştir (Tablo 5).

**Tablo 5.** İçme suyu sıcaklığı ve yerleşim sıklığının hareketsizlik süresi ve H/L oranına etkisi.

Faktör	Hareketsizlik Süresi (sn)	H/L oranı
<i>Su Sıcaklığı</i>		
Normal	228,40	0,64
Soğuk	171,06	0,63
<i>Yerleşim Sıklığı</i>		
12 piliç/m <sup>2</sup>	177,62 <sup>b</sup>	0,59 <sup>b</sup>
15 piliç/m <sup>2</sup>	218,90 <sup>ab</sup>	0,64 <sup>ab</sup>
18 piliç/m <sup>2</sup>	232,67 <sup>a</sup>	0,68 <sup>a</sup>
SEM <sup>1</sup>	16,00	0,01
<i>Su Sıcaklığı x Yerleşim Sıklığı</i>		
Normal-12 piliç/m <sup>2</sup>	144,65	0,59
Normal-15 piliç/m <sup>2</sup>	179,70	0,64
Normal-18 piliç/m <sup>2</sup>	188,85	0,68
Soğuk-12 piliç/m <sup>2</sup>	175,55	0,59
Soğuk-15 piliç/m <sup>2</sup>	228,95	0,64
Soğuk-18 piliç/m <sup>2</sup>	280,70	0,67
SEM <sup>2</sup>	39,193	0,03
<i>Önemlilik(P)</i>		
Su Sıcaklığı	0,096	0,759
Yerleşim Sıklığı	<0,05	<0,05
Su Sıcaklığı x Yerleşim Sıklığı	0,192	0,998

<sup>1</sup>: Ortalamanın standart hatası, <sup>2</sup>: İnteraksiyonun standart hatası, <sup>a, b</sup>: Aynı sütunda farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir

## Tartışma ve Sonuç

Araştırmada, aydınlatma programı bakımından Avrupa Birliği refah mevzuatı kapsamında belirtilen ve etlik piliç refahı açısından kabul gören aydınlatma programlarına benzer olacak şekilde aydınlatma programı kullanılmıştır. Etlik piliç yetiştiriciliğinde yüksek canlı ağırlık kazanılması için yemin sürekli tüketilmesini sağlamak amacıyla ticari işletmelerin genelinde 24 saat devamlı aydınlatma ya da 23 saat aydınlık-1 saat karanlık gibi aydınlık dönemi uzun olan aydınlatma programları tercih edilmektedir. Diğer taraftan ise uygulanan uzun aydınlatma süreleri ile bazı bağışıklık sistemi parametreleri arasında bir bağlantı olduğu ve sürekli aydınlatmanın diurnal ritmi (ışığa bağlı hareket) bozması nedeniyle hayvan refahı yönünden uygun olmadığı bildirilmektedir (Başer ve Yetişir, 2010). Avrupa ülkelerinin birçoğunda hayvan refahı kapsamında etlik piliçlerin refahının korunmasına yönelik çıkarılan yasal düzenlemelerde, aydınlatma programları kapsamında sürekli aydınlatma yerine karanlık dönem içeren kısıtlı, aralıklı ya da giderek artan aydınlatma programları ön plana çıkmıştır. Bahsedilen alternatif aydınlatma programlarının ayak-bacak sağlığına olumlu etkilerinin yanında stres ve korku düzeyi üzerinde de olumlu etkiye sahip olduğu şeklinde bildirişler bulunmaktadır (Fidan ve ark., 2017; Onbaşlar ve ark., 2008).

Araştırmada, yerleşim sıklığının en az olduğu grupta (12 piliç/m<sup>2</sup>) kesim ağırlığının, yerleşim sıklığının fazla olduğu (15 ve 18 piliç/m<sup>2</sup>) gruplara göre daha yüksek bulunması literatürlerdeki (Gholami ve ark., 2020; Kryziu ve ark., 2018; Simitzis ve ark., 2012) bildirişlere paralellik göstermektedir. Yerleşim sıklığının artmasına bağlı olarak kesim ağırlığının olumsuz etkilenmesi, bölmede piliç başına düşen yemlik uzunluğu ve alanının azalması ve hayvanlarda stresin artmasına bağlı olarak şekillenmiş olabilir.

Ayak tabanı ve tarsal bölge yangısı üzerine içme suyu sıcaklığının etkisinin olmadığı görülmüştür. Yerleşim sıklığının tarsal bölge yangısı oluşumunu artırmasına rağmen etkisinin önemsiz olduğu görülmektedir. Zhao ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada yerleşim sıklığının ayak tabanı ve tarsal bölge yangısı üzerine etkisinin önemli olduğu bildirilmiştir. Araştırmada, yüksek çevre sıcaklığı altında yetiştirilen etlik piliçlerin gelişimlerinin yavaş olması, canlı ağırlık değerlerinin olması gerekenden daha düşük olması sonucu piliçlerde ayak tabanı ve tarsal bölge yangısı problemlerinin önemli düzeyde artmadığı düşünülmektedir.

Araştırmada, tüy kirliliği görülme sıklığının skor 1'de 12 piliç/m<sup>2</sup> yerleşim sıklığı grubunda (%37,5) 15 ve 18 piliç/m<sup>2</sup> sıklık gruplarına (sırasıyla %40,0 ve 47,5) göre daha düşük değerde olduğu belirlenmiştir. Ancak, tüy kirliliği açısından yerleşim sıklığı grupları arasındaki farklılıkların istatistiksel

olarak önemli bulunmadığı görülmektedir. Bu bağlamda, çalışma sonucu ile uyumlu olarak yüksek yerleşim sıklığı altında yetiştirilen etlik piliçlerde tüy yapısının daha kirli olduğu bildirilmiştir (Gocsik ve ark., 2016). Fidan ve ark. (2020) yaptıkları çalışmalarında, tüy kirlilik durumunun altlık kalitesi ile doğrudan ilgisinin olduğunu saptamışlar ve altlık nem oranının artmasının bacak sağlığı ve tüy kirliliği zararını olumsuz yönde etkilediğini belirtmişlerdir. Araştırmada, yerleşim sıklığının tüy kirliliği üzerine etkisinin önemsiz bulunması, altlığın kuru ve temiz kalması neticesinde şekillenmiş bir sonuç olabileceğini düşündürmektedir.

Yürüme gücünü ve ileri seviyedeki topallıklar etlik piliçlerde refah ve sağlık durumu bakımından önemli bir sorun oluşturmaktadır (Kittelsen ve ark., 2017). Yürüme skoru üzerine etkileri incelenen su sıcaklığı faktörünün ele alındığı herhangi bir çalışmaya yapılan literatür taramasında rastlanamamıştır. Araştırmada, soğuk içme suyu grubunda yürüme skorunun normal içme suyu grubuna göre önemli düzeyde daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Soğuk içme suyu grubundaki piliçlerin yürümeye daha fazla zaman ayırdıkları, daha az oranda yürüme bozukluğuna sahip oldukları ve yürüme skoru bakımından refah düzeyinin daha iyi olduğu söylenebilir. Etlik piliçlerde yerleşim sıklığı gruplarında yürüme skorunun arttığı belirlenmiş, fakat önemlilik tespit edilmemiştir. Elde edilen sonuçlar Hongchao ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışma ile benzerlik göstermektedir. Fakat Knowles ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada yerleşim sıklığının yürüme skorunu önemli düzeyde artırdığı tespit edilmiştir. Yerleşim sıklığının artması sonucu etlik piliçlerin yürümeye daha az zaman harcadığı ve daha az hareket ettiği, bunun sonucu olarak da yürümede zorlandıkları söylenebilir.

Etlik piliçlerde tüy zararı skoru önemli bir refah ölçü kriteri olarak kullanılabilir (Fidan ve ark., 2020; Zhao ve ark., 2013). Araştırmada tüy zararı skoruna içme suyu sıcaklığının but, kanat ve kuyruk bölgelerinde önemli düzeyde etkili olduğu tespit edilmiş olup, soğuk içme suyu grubunda tüy kaybının daha az olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuca göre soğuk içme suyu grubunda yetiştirilen piliçlerin refah düzeyinin daha iyi olduğu söylenebilir. Yerleşim sıklığı bakımından etlik piliçlerin tüy zararı skoru incelendiğinde metrekarede daha fazla sayıda etlik piliç yetiştirilen gruplarda tüy kaybı oranı daha yüksek olmasına rağmen, gruplar arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucuna benzer olarak yerleşim sıklığının tüy zararı skorunu önemli derecede artırdığı bildirilmiştir (Gocsik ve ark., 2016). Canlı ağırlık düzeyinin olması gerekenden düşük olması ve yerleşim sıklığının çok fazla

olmaması nedeniyle bu sonucun elde edildiği söylenebilir.

İçme suyu sıcaklığı grupları arasında hareketsizlik süresi bakımından önemli bir farklılık bulunmasa da, soğuk içme suyu grubundaki piliçlerin hareketsizlik süresinin (171,06 sn) normal içme suyu grubuna (228,40 sn) göre daha kısa olduğu belirlenmiştir. Bu durum, soğuk su tüketen piliçlerin düşük düzeyde stres altında olmasıyla açıklanabilir. Yerleşim sıklığının ise hareketsizlik süresi üzerine etkisinin önemli olarak elde edilmesi benzer çalışma ile uyumludur (Buijs ve ark., 2009). Bunun yanı sıra, Son (2013) yaptığı çalışmada yerleşim sıklığının hareketsizlik süresini etkilemediğini bildirmiştir. Araştırma sonuçlarındaki farklılığın etlik piliçlerin çok sayıda iç ve dış faktörden etkilenerek farklı düzeyde strese maruz kalmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. İçme suyu sıcaklığının H/L oranı üzerine olan etkisinin önemli olmadığı tespit edilmiştir. Yerleşim sıklığı bakımından metrekareye düşen hayvan sayısı azaldıkça H/L oranının da önemli düzeyde düştüğü tespit edilmiştir. Benzer olarak (Uzum ve Toplu, 2013) yerleşim sıklığının H/L oranına etkisinin önemli bulunduğu bildirilmiştir. Bu bulguların aksine Türkyılmaz (2008) H/L oranı üzerine yerleşim sıklığının önemli bir etkisinin bulunmadığını bildirmiştir. Yerleşim sıklığının artmasına bağlı olarak hayvanlar arası etkileşimin artması ve hayvan başına düşen alanın azalması sonucunda hayvanların strese girmesinin beklenmesi normal bir yaklaşım olarak değerlendirilebilir. Yerleşim sıklığının artmasının etlik piliçlerde stres düzeyinin de artmasına neden olduğu söylenebilir.

Çalışma sonunda, soğuk içme suyu uygulamasının yürüme ve tüy zararı skoru gibi refah parametreleri üzerine istatistiksel olarak önemli etkisi gözlenmiştir. Yüksek çevre sıcaklığı altında yetiştirilen etlik piliçlerde içme suyu sıcaklığının düşürülmesi piliçlerin refah koşullarını artırmak ve sıcak stresi ile başa çıkmalarına yardımcı olmak açısından faydalı olabilir. Düşük yerleşim sıklığı altında yetiştirilen etlik piliçlerde hareketsizlik süresi ve H/L oranının azaldığı ve böylece refah yönünden olumlu sonuçların alınmasının mümkün olabileceği görülmektedir.

## Kaynaklar

- Başer E, Yetişir R, 2010: Farklı aydınlatma programlarının etlik piliç performansı ve refahı üzerine etkisi. *Hay Üret*, 51(2), 68-76.
- Bilgili SF, Alley MA, Hess JB, Nagaraj M, 2006: Influence of age and sex on footpad quality and yield in broiler chickens reared on low and high density diets. *J Appl Poult Res*, 15, 433-441.
- Bruno LDG, Maiorka A, Macari M, Furlan RL, Givisiez PEN, 2011: Water intake behavior of broiler chickens



- exposed to heat stress and drinking from bell or and nipple drinkers. *Braz J Poult Sci*,13(2), 147-152.
- Buijs S, Keeling L, Rettenbacher S, Van Poucke E, Tuytens FAM, 2009: Stocking density effects on broiler welfare: Identifying sensitive ranges for different indicators. *Poult Sci*,88, 1536-1543.
- Dozier WA, Thaxton JP, Purswell JL, Olanrewaju HA, Branton SL, Roush WB, 2006: Stocking density effects on male broilers grown to 1.8 kilograms of body weight. *Poult Sci*,85, 344-351.
- Duncan DB, 1955: Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*,11, 1-42.
- Erensayın C, 2000: Bilimsel-Teknik-Pratik Tavukçuluk. Et tavukçuluğu ve kuluçka. Nobel Yayın Dağıtım. Cilt 1, 2. Baskı, p 446-453, Ankara, Türkiye.
- EU, 2007: Council of the European Communities, 2007/43/EC, Council Directive. Laying Down Minimum Rules for the Protection of Chickens Kept for Meat Production, Off. J.L., 182, 19-28.
- Fidan ED, Nazlıgül A, Türkyılmaz MK, Aypak SÜ, Kilimci FS, Karaarslan S, Kaya M, 2017: Effect of photoperiod length and light intensity on some welfare criteria, carcass, and meat quality characteristics in broilers. *R Bras de Zootec*,46(3), 202-210.
- Fidan ED, Kaya M, Nazlıgül A, Türkyılmaz MK, 2020: The Effects of Perch Cooling on Behavior, Welfare Criteria, Performance, and Litter Quality of Broilers Reared at High Temperatures with Different Litter Thicknesses. *Braz J Poultry Sci*,22(3), 1-12.
- Gholami M, Chamani M, Seidavi A, Sadeghi AA, Aminafshar M, 2020: Effects of stocking density and environmental conditions on performance, immunity, carcass characteristics, blood constituents, and economical parameters of Cobb 500 strain broiler chickens. *Ital J Anim Sci*,19(1), 524-535.
- Gocsik É, Brooshooft SD, de Jong, IC, Saatkamp HW, 2016: Cost-efficiency of animal welfare in broiler production systems: A pilot study using the WelfareQuality® assessment protocol. *Agric Syst*,146, 55-69.
- Gross WB, Siegel HS, 1983: Evaluation of heterophyl/lymphocyte as a measurement of stress in chickens. *Avian Dis*,27, 972-979.
- Hongchao J, Jiang Y, Song Z, Zhao J, Wang X, Lin H, 2014: Effect of perch type and stocking density on the behaviour and growth of broilers. *Anim Prod Sci*,54(7), 930-941.
- Jones RB, Faure JM, 1980: Tonic immobility (righting time) in the domestic fowl: Effects of various methods of induction. *IRSC Medical Science*,8, 184-185.
- Kestin SC, Knowles TG, Tinch AE and Gregory NG, 1992: Prevalence of leg weakness in broiler chickens and its relationship with genotype. *Vet Rec*,131, 190-194.
- Kittelsen KE, David B, Moe RO, Poulsen HD, Young JF, Granquist EG, 2017: Associations among gait score, production data, abattoir registrations, and postmortem tibia measurements in broiler chickens. *Poult Sci*,96(5), 1033-1040.
- Knowles TG, Kestin SC, Haslam SM, Brown SN, Green LE, Butterworth A, Pope SJ, Pfeiffer D, Nicol CJ, 2008: Leg disorders in broiler chickens: prevalence, risk factors and prevention. *PLoS One*,3(2), e1545.
- Kretzschmar-McCluskey V, Fisher C, Tuijl OV, 2014: A practical guide to managing feather cover in broiler breeder females. *Aviagen Ross Tech Note*.
- Kryeziu AJ, Kamberi M, Muji S, Mestani N, Berisha S, 2018: Carcass traits of broilers as affected by different stocking density and sex. *Bulg J Agric Sci*,24(6), 1097-1103.
- Onbaşıl EE, Poyraz Ö, Erdem E, Öztürk H, 2008: Influence of lighting periods and stocking densities on performance, carcass characteristics and some stress parameters in broilers. *Arch für Geflügelkunde*,72(5), 193-200.
- Özdamar K, 2004: Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi 1. Kaan Kitapevi, Türkiye.
- Park SO, Hwangbo J, Ryu CM, Yoon JS, Park BS, Kang HK, Seo OS, Chae HS, Choi HC, Choi YH, 2013: Effects of extreme heat stress and continuous lighting on growth performance and blood lipid in broiler chickens. *J Korean Appl Sci Technol*,30(1), 78-87.
- RSPCA, 2017: Royal Society of Protection for Cruelty of Animals, Welfare standards for meat chickens.
- Simitzis PE, Kalogeraki E, Goliomytis M, Charismiadou MA, Triantaphyllopoulos K, Ayoutanti A, Niforou K, Hager-Theodorides AL, Deligeorgis SG, 2012: Impact of stocking density on broiler growth performance, meat characteristics, behavioural components and indicators of physiological and oxidative stress. *Br Poult Sci*,53(6), 721-730.
- Son J, 2013: The effect of stocking density on the behaviour and welfare indexes of broiler chickens. *J Agric Sci Technol*,3, 307, 311.
- Türkyılmaz MK, 2008: The Effect of Stocking Density on Stress Reaction in Broiler Chickens during Summer. *Turk J Vet Anim Sci*,32(1), 31-36.
- Uzum MH, Toplu HO, 2013: Effects of stocking density and feed restriction on performance, carcass, meat quality characteristics and some stress parameters in broilers under heat stress. *Rev Med Vet*,164, 546-554.
- Welfare Quality, 2009: Welfare quality assessment protocol for poultry (broilers, laying hens). Lelystad: WelfareQuality® Consortium.
- Yoon JS, Kang HK, Ryu CM, Park SO, Park BS, Hwangbo J, Seo OS, Chae HS, Choi HC, Choi YH, 2013: Effects of inverse lighting and diet with soy oil on growth performance and short chain fatty acid of broiler exposed to extreme heat stress. *J Korean Appl Sci Technol*,30(1), 127-138.
- Zhao JP, Jiao HC, Jiang YB, Song ZG, Wang XJ, Lin H, 2013: Cool perches improve the growth performance and welfare status of broiler chickens reared at different stocking densities and high temperatures. *Poult Sci*,92(8), 1962-1971.

\*Yazışma Adresi: Mehmet KAYA

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

e-mail: mehmet.kaya@adu.edu.tr

## An Evaluation of Silage Widely Use in Animal Feeding in Terms of Legislation in Turkey and European Union

Gökhan ASLIM<sup>1,a,\*</sup>, Emine Merve DANIŞ<sup>1,b</sup>

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji AD, Konya, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID ID; 0000-0001-5976-8186, <sup>b</sup>ORCID ID; 0000-0003-0296-4391

Geliş Tarihi: 08.06.2021

Kabul Tarihi: 09.10.2021

**Abstract:** Silage is a source of roughage obtained by anaerobic fermentation of fresh green feeds, certain vegetable products, and agricultural and industrial waste. Silage is widely used to feed animals and is importance for animals, humans, and the environment. This study, it was aimed to examine the production, use, and importance of silage, which is widely used in animal nutrition, in terms of legislation. Therefore, the study analyzed national and European Union legislation on the subject. For this purpose, content analysis was carried out on the relevant Turkey and European Union legislation. The scans determined that seven national and four European Union regulations could be related to issues animal feeding and silage. Therefore, it can be said that the issues related to silage management, including the precautions from production to consumption, should be defined in a way that minimizes the detrimental effects on animal, human and environmental health. Accordingly, specific regulations should be made on silage.

**Keywords:** Animal feeding, Legislation, Silage.

### Hayvan Beslemede Yaygın Olarak Kullanılan Silaj Yeminin Avrupa Birliği ve Türkiye’de Mevzuat Açısından Değerlendirilmesi

**Özet:** Silaj; taze yeşil yemler, diğer bazı bitkisel ürünler ile tarımsal ve endüstriyel artıkların oksijensiz ortamlarda fermantasyonu ile elde edilen kaba yem kaynağıdır. Silaj, hayvan beslemede yaygın olarak kullanılmakta, hayvan, insan ve çevre açısından önem taşımaktadır. Çalışmada hayvan beslemede yaygın olarak kullanılan silajın üretimi, kullanımı ve öneminin mevzuat açısından incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla konuyla ilgili Türkiye ve Avrupa Birliği mevzuatına içerik analizi yapıldı. Yapılan taramalarda hayvan besleme ve silaj konusu ile ilgili olabilecek yedi ulusal ve dört Avrupa Birliği düzenlemesi olduğu belirlendi. Üretimden tüketime kadar olan önlemler de dahil olmak üzere silaj yönetimi ile ilgili hususların hayvan, insan ve çevre sağlığı üzerindeki zararlı etkilerini en aza indirecek şekilde tanımlanması ve bu doğrultuda silaj konusunda spesifik düzenlemeler yapılması gerektiği söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Hayvan besleme, Mevzuat, Silaj.

### Introduction

The livestock industry, which grows with the increasing world population (Eleroğlu et al., 2012; Tırınk, 2021), brings critical environmental problems in both developed and developing countries (Eleroğlu et al., 2012). As in all economic activities, agriculture and livestock also create significant pressure on the environment, as it is based on existing natural resources and the use of these resources (Dişbudak, 2008; Peypazar and Kılıç, 2021). The imbalances that occur while trying to increase the yield by forcing the plant, then the animal, starting from the soil, are directly reflected on the human being. Though it is late, it is understood that the findings, which increase income and productivity, have drawbacks that cannot be underestimated. Even if the attempts made to achieve economically favorable results by increasing the yield seem successful in the short

term, it is seen that they cause various problems after a while (Koçtürk, 1975).

Animal nutrition involves providing the feed required by animals economically (Görgülü, 2002). Silage is an animal feed that has been pretty widely used in recent years due to its economic benefits in animal feeding (Çakmak et al., 2013; Yaylak and Alççek 2003). Presently, silage is a highly preferred feed component in animal feeding. Silage is obtained by compacting and storing fresh fodder materials under the influence of certain specific bacteria under anaerobic conditions. Thus, silage encompasses all kinds of plants and forage crops eaten by animals. It is processed and broken down under anaerobic conditions while retaining its nutritional value or even increasing it. It is stored for use during seasons when green feed is unavailable (Şahin and Zaman, 2010).

It is believed that the preservation of feeds in silo form dates to ancient history. The first green forage silage was believed to be made by peasants in Italy in 700 AD. It is reported that silage production started in other European countries in the 18th century. The first studies on silage were performed in 1862 in Germany, in 1877 in France, and 1883 in the USA. In Turkey, the first silage was made in the Atatürk Forest Farm in 1931. It was initially produced only in state farms until 1975, after which silage production spread across the country (Şahin and Zaman, 2010; Uygur, 2005).

In several parts of the world, silage is an essential component of ruminant feeding when fresh crops are unavailable. Overall, given the excellent management and improved equipment available today, silage offers the best possibilities to maximize and maintain the nutritional value of a particular product from harvest to feeding (Pahlow et al., 2003). Economically, silage is cheaper than other feeds, with lower warehouse costs (Özhan, 2010) and labor requirements (Şahin and Zaman, 2010). Despite these advantages (Özhan, 2010; Şahin and Zaman, 2010), both microbial (e.g., *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*) and chemical hazards (nitric oxide and nitrogen dioxide) may be associated with silage (Driehuis et al., 2018), which can exert harmful effects on human, animal, and environmental health (Peterson et al., 1958). In this direction, the solve the problems that silage can cause also becomes very important.

In parallel with the increase in the scope and intensity of environmental problems, economic and political ones are also increasing. However, the search for solutions to problems is intensifying (Ünder, 1996). The environmental issue is a significant issue within the scope of European Union (EU) policies. It is seen that agriculture and livestock

activities are trying to be integrated with the protection of the environment (Dişbudak, 2008). Implementing the legislation in force in livestock enterprises and inspecting these practices will also be very beneficial in reducing the problems that may arise in terms of animals, humans, and the environment (Boyacı et al., 2011).

Therefore, this study evaluated the effects of silage usage, which presently represents a significant part in animal feeding management on animal, human, and environmental health, emphasizing the legislative aspects.

## Materials and Methods

This study analyzed the Turkey (Law, Regulations, and Notices) and European Union (EU) legal regulations (Regulations, Directives, and Rules) regarding silage feed. By analyzing the content of the relevant legislative texts, the legal framework related to silage was determined.

In this study, the “document analysis method” was used from the available qualitative data analysis methods (Yıldırım and Şimşek, 2013).

The legal framework related to “silage feed” was determined by “content analysis” of the relevant legislative texts on the subject. The obtained data were evaluated within the scope of the legislative.

No ethical information is required for this study.

## Results

It was determined that seven legal regulations related to animal feeding and silage feed in Turkey (Table 1) and four legal regulations (Table 2) in the EU.

**Table 1.** National regulations published on silage.

Institution	Regulations	Official Gazette Date
<b>Ministry of Agriculture and Forestry</b>	Veterinary Services, Plant Health, Food, and Feed Law	13/6/2010
	Regulation on Official Controls of Food and Feed	17/12/2011
	Regulation on Feed Hygiene	27/12/2011
	Regulation Regarding the Use of Feed Additives Substances in Animal Nutrition	18/7/2013
	Notice on Unwanted Substances in Feeds	19/4/2014
	Regulation on the Sampling and Analysis Methods for Official Control of Feeds	21/1/2017
<b>Ministry of Environment and Urbanisation</b>	Waste Management Regulation	02/4/2015

**Table 2.** EU regulations on silage.

Regulations	Numbered	Dated
Regulation (EC) of the European Parliament and of the Council on Additives for Use in Animal Nutrition	1831/2003	22/9/2003
Commission Regulation (EC) Laying Down the Methods of Sampling and Analysis for the Official Control of Feed	152/2009	27/1/2009
Commission Directive amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards mercury, free gossypol, nitrites and Mowrah, Bassia, Madhuca	2010/6	10/2/2010
Commission Implementing Regulation (EU) Concerning the Authorisation of Sodium Benzoate, Potassium Sorbate, Formic Acid and Sodium Formate as Feed Additives for All Animal Species	2016/2023	18/11/2016

Turkey's accession process to the EU, an outstanding act with No. 5996 "Veterinary Services, Plant Health, Food, and Feed Law" was adopted by the Turkish Government regarding food, agriculture, and animal husbandry. One statement of this act was on protecting and ensuring feed safety, public health, animal health, and environmental health. In another article of the above act, it was described that "To ensure the enforcement of this Law, the Ministry conducts official controls on all stages of production, processing, and distribution of food and feed operators, and keeps records on food and feed businesses" (Official Gazette, 2010).

The Annex-2 of Law No. 5996 states that the control officers who carry out the official controls of the feed establishments are veterinarians, agricultural engineers, and aquaculture engineers (Official Gazette, 2010). However, there are secondary legislative texts on feeds based on Law No. 5996. One of these legislative texts is on the "Regulation on Official Controls of Food and Feed." The fifth article states that the control officer carries out the "Official checks of feed establishments" within the regulation under the list of Annex-2 included in the Annex of the Law. In official controls, technicians, operators, and assistant health personnel who are trained in related professions can also be assigned to assist the control officer." As far as the entire regulation is concerned, there is no article on the control of silage (Official Gazette, 2011a).

The "Regulation on the Sampling and Analysis Methods for Official Control of Feeds," prepared based on the "Commission Regulation" (European Commission, 2009) numbered EC 152/2009, was published in the Official Gazette on January 21, 2017, and implemented since then. It was determined in the annexes of the regulation that the works and procedures to be conducted on the

samples to be taken from the feeds were included. However, the specific analyses for microbial and chemical hazards that may occur in the silage were not included (Official Gazette, 2017). The "2020 Analysis List" of the Ministry of Agriculture and Forestry Central Research Institute of Food and Feed Control recommended that the "pesticide analysis" should be carried out "for silage feeds" (MAF, 2019). Also, it was recommended by the Directorate of the International Center for Livestock Research and Training affiliated to the Ministry that "Silage Acids" and "Corn Silage Energy Value Calculation" analyses should be conducted on silage (MAF, 2020).

In the "Notice on Unwanted Substances in Feeds" Annex-1, which was prepared in line with the rates set in the EU Commission Directive numbered 2010/6/EU (European Commission, 2010) and published in the Official Gazette on April 19, 2014, the acceptable rates of unwanted substances in feeds were determined. It was stated that nitrites should not be present in silage according to the food containing 12% moisture. In other regulations, no other rate is specified for other microbial and/or chemical hazards that may occur in the silage (Official Gazette, 2014).

The regulations of the EU on additives used in animal nutrition (EC 1831/2003) contain special provisions regarding the evaluation of the products used as silage additives (European Commission, 2003). According to the Annex of the Commission's EU 2016/2023 regulation, the minimum and maximum limits of products such as "sodium benzoate, potassium sorbate, formic acid, and sodium formate", which are accepted as additives, were determined according to feed ingredients with a moisture content of 12%. Operational procedures and institutional precautions should be determined for additive and premix users to address the potential risks arising from their use by feed

operators (European Commission, 2016). In Turkey, only the identification of silage additives is available as per the "Regulation Regarding the Use of Feed Additives Substances in Animal Nutrition" regarding silage. In this document, "silage additives" are defined as "Substances, including enzymes and microorganisms prepared to join the food to improve silage formation." In the 11th article of the regulation, after the approval of a feed additive according to this regulation, the person or other interested parties who use or put in the market a feed in which this additive is used must comply with the conditions or limitations set for placing in the market, use, and storage of the feed additive (DEFRA, 1997). The Ministry carries out inspection and control processes of feed additives-premixes, and statements are included. In the Annex-1 of the same regulation, the category, including "Silage additives" also included the category "Technological feed additives" (Official Gazette, 2013).

In the sixth article of the "Regulation on Feed Hygiene," it was stated that "Feed operators are responsible for the primary production of feeds and their transport, storage, treatment or transport of these feeds to a business or mixing of feeds using no additives or premixes for their animals. They must comply with the conditions stated in Annex-1 regarding their works." (Official Gazette, 2011b).

The definition of H14 Ecotoxic is included in the Annex 3/A section of the "Waste Management Regulation", which came into force on April 2, 2015, by the Ministry of Environment and Urbanization. H14 Ecotoxic is defined as "wastes that have sudden or delayed harmful effects on one or more parts of the environment." Moreover, in the waste list coded 02 01, under the heading of "Waste from Agriculture, Gardening, Aquaculture Production, Forestry, Hunting, and Fishing," "plant tissue waste" was included. When the entire regulation was evaluated, it was observed that no provision could be directly related to silage (Official Gazette, 2015).

## Discussion

In UK countries, clear and detailed arrangements have been made at every stage of silage production (silage tanks, their distance to inland waters and coastal waters, additives, storage conditions, etc.) (WAG, 2010). However, due to its various undesirable effects, silage production is not recommended in certain parts of Europe (Wilkinson, 1999). During the conducted survey of the legislation, it was observed that after the enactment of Law No. 5996 in Turkey, various regulations on "feed" came into force; however, there was no specific regulation regarding "silage." It can be suggested that, in terms of human, animal,

and environmental health, specific legal regulations should be made on silage, supported by scientific data, which may cause various hazards and is not even recommended for production in certain countries.

The proliferation of *E. coli* in the silo (Driehuis et al., 2018) and the presence of molds indicate the entry of air into the silo, implying that the compression and closing operations are not performed appropriately during ensiling (Basmacıoğlu and Ergül, 2002). When silage is used as a feed source on a farm, several events related to increased clostridial spores in silage and milk can occur. While harvesting a silage crop, the crop is inevitably contaminated with soil particles containing clostridial spores (Pahlow et al., 2003). Multiple mycotoxin contaminations in silage are crucial due to their effects on animals (Dell'Orto et al., 2015). In Poland, in 2015, all the tested silage samples from 120 farms were positive for at least one mycotoxin, and 61% contained five or more mycotoxins simultaneously (Panasiuk et al., 2018). Similarly, Karakaya and Atasever (2010) found that aflatoxin was present in the feed and milk in Pasinler, Erzurum. The authors stated that this situation might cause chronic health problems in humans. Şahindokuyucu et al. (2010) observed various mycotoxin types in corn silage samples in their study in the Burdur province. They reported no requirement of a mandatory analysis of mycotoxins, microbial, or chemical threats, as evidenced by a detailed legislation check. Notably, every aspect of silage has different importance apart from the mycotoxins, which can be found in silage at high concentrations. Therefore, these hazards can occur in silage produced unprofessionally. It should be ensured that farmers and business owners involved in silage production are educated and made aware by relevant professionals to understand the issue's importance. From a legal perspective, regular sampling of silage and mandatory analysis of mycotoxin, microbial, and chemical content can be critical. Therefore, establishing a silage inspection mechanism is essential to establish legal regulations that will ensure planned inspection.

It has been stated that silage additives increase the quality of silage and productivity of animals. For this purpose, various groups of substances are used (Yitbarek and Tamir, 2014). According to the recommendation of the "EU Commission Implementing Regulation" and "European Food Safety Authority (EFSA)" under the proposed conditions of use, sodium benzoate, potassium sorbate, formic acid, and sodium formate have no adverse effects on animal health, human health, or the environment. However, it has also been

suggested that the respiratory risk of these substances cannot be excluded. Moreover, the risks of additives used and all necessary measures have been specified (EFSA, 2012; EFSA, 2013; EFSA, 2014; EFSA, 2015). While there is abundant information about feed additives in the national legislation, it has been observed that there is no substance and/or provision to deal with silage for the use of mentioned substances. It can be argued that more detailed regulations regarding additives should be created, as in the regulations issued by the EU.

The Department for Environment Food & Rural Affairs (DEFRA) regulations numbered 1991/324 and 1997/547 state that silage wastes are 100 times more polluting than untreated water. Therefore, care must be taken to minimize the risk of pollution by farmers. It has also been stated that silage causes significant pollution due to insufficient storage capacity or poor storage (DEFRA, 1997). During the production and storage of silage, discharge of silage water into the soil or surrounding water resulting from poor drainage is harmful to the environment (Peterson et al., 1958). Silage wastes equally contribute to environmental pollution outside the growing season or when they spread to the soil during improper weather conditions (WAG, 2010). Furthermore, it has been demonstrated that silage can contain toxins from forage harvesting or various contaminants (Driehuis et al., 2018; Ogunade et al., 2018). Although the definition of "Ecotoxic" is included in the Annex to the "Waste Management Regulation," it is unclear whether the silage water is evaluated within this scope. Therefore, scientific studies and data on this subject should be used to evaluate the damage to the environment by silage and its wastewater, and appropriate measures should be taken accordingly.

Despite the advantages of silage, various problems occur in animal, human, and environmental health during its production and management phase. In order to minimize these problems, scientific methods should be applied at every stage of silage production. Furthermore, specific national regulations regarding silage should be drafted based on EU regulations while giving equal weightage to the damage to human health, animal health, and the environment. Thus, by understanding our responsibility for future generations, scientific studies and data obtained on silage should be evaluated in terms of legislative studies that should be conducted in this direction.

### Financial Support

This research received no grant from any funding agency/sector.

### Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### Kaynaklar

- Basmacıoğlu H, Ergül M, 2002: Silage microbiology. *J Anim Prod*, 43, 12-24.
- Boyacı S, Akyüz A, Kükürtcü M, 2011: Büyükbaş hayvan barınaklarında gübrenin yarattığı çevre kirliliği ve çözüm olanakları. *Tabad*, 4 (1), 49-55.
- Çakmak B, Yalçın H, Bilgen H, 2013: Hasıl ve fermente mısır silajlarının ham besin maddesi içeriği ve kalitesine paketlenme basıncı ve depolama süresinin etkileri. *Tar Bil Der*, 19, 22-32.
- Department for Environment Food and Rural Affairs (DEFRA), 1997: Control of pollution (silage, slurry and agricultural fuel oil) regulations. Resource Document. Department for Environment Food and Rural Affairs. Accessed; 20.10.2019.
- Dell'Orto V, Baldi G, Cheli F, 2015: Mycotoxins in silage: checkpoints for effective management and control. *World Mycotoxin Journal*, 8, 603-617.
- Dişbudak K, 2008: Agriculture and environment interaction in Eu and Turkey's harmonization. EU Expertise thesis, Ministry of Agriculture and Rural Affairs Department of External Affairs and EU Coordination, Ankara.
- Driehuis F, Wilkinson JM, Jiang Y, Ogunade I, Adesogan AT, 2018: Silage review: Animal and human health risks from silage. *J Dairy Sci*, 101, 4093-4110.
- Eleroğlu H, Yıldız S, Yıldırım A, 2013: The applied methods for removal of poultry feces that creates environmental problem. *GBAD*, 2, 14-24.
- European Commission, 2003: Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Official Journal of the European Union, L268/29, 18.10.2003.
- European Commission, 2009: Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Official Journal of the European Union. L 54/1, 26.2.2009.
- European Commission, 2010: Commission Directive 2010/6/EU. amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards mercury, free gossypol, nitrites and Mowrah, Bassia, Madhuca. Official Journal of the European Union, L37/29, 10.02.2010.
- European Commission, 2016: Commission Implementing Regulation (EU) 2016/2023. concerning the authorisation of sodium benzoate, potassium sorbate, formic acid and sodium formate as feed additives for all animal species. Official Journal of the European Union. L313/14, 19.11.2016.
- European Food Safe Authority (EFSA), 2012: Scientific Opinion on the safety and efficacy of sodium benzoate as a silage additive for pigs, poultry, bovines, ovines, goats, rabbits and horses. *EFSA Journal*, 10 (7), 2779.

- European Food Safe Authority (EFSA), 2013: Scientific Opinion on the safety and efficacy of potassium sorbate as a silage additive for all animals except dogs and cats. *EFSA Journal*, 11 (7), 3283.
- European Food Safe Authority (EFSA), 2014: Scientific Opinion on the safety and efficacy of formic acid when used as a technological additive for all animal species. *EFSA Journal*, 12 (10), 3827.
- European Food Safe Authority (EFSA), 2015: Scientific Opinion on the safety and efficacy of ammonium formate, calcium formate and sodium formate when used as a technological additive for all animal species. *EFSA Journal*, 13 (5), 4056.
- Görgülü M, 2002: Feeding cattle and small cattle. Çukurova University Faculty 206 of Agriculture Offset Workshop, Adana, Türkiye.
- Karakaya Y, Atasever M, 2010: Aflatoxin B1 in corn silage and its probability passing in milk. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (Suppl-A), 123-127.
- Koçtürk ON, 1975: Ecology and veterinary medicine. Turkish Veterinary Medical Association Central Council Publications, No:13, Ankara, Turkey.
- Ministry of Agricultural and Forestry (MAF), 2019: Analysis list. T.C. Ministry of Agriculture and Forestry Central Research Institute of Food and Feed Control. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/bursagida/Belgeler/NKB/2020%20%20F%C4%B0YAT%20L%C4%B0S%20TES%C4%B0%20V5.pdf>. Date of access; 10.03.2020.
- Ministry of Agricultural and Forestry (MAF), 2020: Laboratory analysis fees. T.C. Ministry of Agriculture and Forestry International Center for Livestock Research and Training. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/lalahanhmae/Menu/27/Laboratuvar-Analiz-Ucretleri>. Date of access; 10.03.2020.
- Official Gazette, 2010: Law No: 5996 on Veterinary services, plant health, food and feed. Official Gazette dated 11.06.2010 and numbered 27610.
- Official Gazette, 2011a: Regulation regarding official control of food and feed. Official Gazette dated 17.12.2011 and numbered 28145.
- Official Gazette, 2011b: Regulation on feed hygiene. Official Gazette dated 27.12.2011b and numbered 28155.
- Official Gazette, 2013: Regulation regarding the use of feed additives substances in animal nutrition. Official Gazette dated 18.07.2013 and numbered 28711.
- Official Gazette, 2014: Communiqué on undesirable substances in feeds. Official Gazette dated 19.04.2014 and numbered 28977.
- Official Gazette, 2015: Waste management regulation. Official Gazette dated 02.04.2015 and numbered 29314.
- Official Gazette, 2017: (Repeating). Implementing regulation on sampling and analysis methods for official control of feeds. Official Gazette dated 21.01.2017 and numbered 29955.
- Ogunade IM, Martinez-Tupia C, Queiroz OCM, Jiang Y, Drouin P, Wu F, Vyas, D, Adesogan AT, 2018: Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *J Dairy Sci*, 101 (5), 4034-4059.
- Özhan M, 2010: SILAGE (Silo Feed) preparation, use and value. *Atatürk Univ J Agricultural Faculty*, 6, 51-61.
- Pahlow G, Muck RE, Driehuis F, Oude Elfrink SJWH, Spoelstra SF, 2003: Microbiology of ensiling. In: L. Al-Amoodi (Ed.), 31-93. Silage science and technology. Wisconsin, USA.
- Panasiuk L, Jedziniak P, Pietruszka K, Piatkowska P, Bocian L, 2018: Frequency and levels of regulated and emerging mycotoxins in silage in Poland. *Mycotoxin Res*, 35, 17-25.
- Peterson W, Burris RH, Sant R, Little HN, 1958: Toxic gases in silage, production of toxic gas (nitrogen oxides) in silage making. *J. Agric. Food Chem.*, 6, 121-126.
- Peypazar ZB, Kılıç İ, 2021: Evaluation of waste management systems in dairy cattle farms in terms of environmental pollution: Kütahya case study. *Uludağ Univ. J. Fac. Eng.*, 26 (1), 15-28.
- Şahin İF, Zaman M, 2010: An Important Cattle Feed: SILAGE. *Eastern Geographical Review*, 15, 1-18.
- Şahindokuyucu F, Mor F, Oğuz MN, Karakaş Oğuz F, 2010: Investigation of mycotoxins occurrence and levels in silages samples collected in Burdur province. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.*, 29, 49-54.
- Tırınk S, 2021: Environmental effects and diffuse pollution load calculation of animal wastes in Iğdır province and districts. *BSJ Eng Sci*, 4 (2), 43-50.
- Uygur MA, 2005: What is Silage? Its History, Importance, Benefits and Silage Making Stages. T.C. Ministry of Agriculture and Rural Affairs, General Directorate of Agricultural Research, Aegean Agricultural Research Institute, Farmer Brochure, İzmir, Turkey.
- Ünder H, 1996: Çevre felsefesi: etik ve metafizik görüşler. Doruk Yayıncılık, Ankara.
- Welsh Assembly Government (WAG), 2010: The water resources (control of pollution) (silage, slurry and agriculture fuel oil) (wales) regulations. Welsh Assembly Government dated 18 June 2010 and numbered 1493 (W.136).
- Wilkinson JM, 1999: Silage and animal health. *Natural Toxins*, 7, 221-232.
- Yaylak E, Alçiçek A, 2003: A cheap forage source for the fattening of beef cattle: corn silage. *Hayvansal Üretim*, 44 (2), 29-36.
- Yıldırım A, Şimşek H, 2013: Sosyal bilimlerde nitel araştırma yöntemleri. Genişletilmiş 9. Baskı. Seçkin/Sosyal Bilimler, Ankara.
- Yitbarek MB, Tamir B, 2014: Silage additives. *Open J. Appl. Sci*, 4, 258-274.

\*Yazışma Adresi: Gökhan ASLİM

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji AD, Konya, Türkiye.

e-mail: gokhan.aslim@selcuk.edu.tr

## Effects of IPARD Programme on Animal Husbandry in Aydın

M. Kenan TÜRKYILMAZ<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Science, Aydın, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-7600-2390

Geliş Tarihi: 27.06.2021

Kabul Tarihi: 07.11.2021

**Abstract:** The first aim of this study was to investigate the utilization of IPARD financial supports controlled by Agriculture and Rural Development Support Institution (ARDSI) by county and production basis. Secondly, the assessment of these enterprises' structural and administrative status of except industrial milk and meat processing enterprises at the enterprise level was aimed. The study was performed with data collected via questionnaire forms from 37 dairy, beef and broiler enterprises. It is estimated that animal producers have got 54536884.28 TL as support in IPARD-I financial support within 9-15<sup>th</sup> calls. It is calculated that milk production was the leader in total supports with 22328683.05 TL (40.9%). It is determined that Germencik and Yenipazar counties have the most significant shares, while Karpuzlu and Sultanhisar have minor investments. In terms of the number of contracts, it is calculated that the biggest share belonged to Yenipazar and Efeler counties with 10 and 9 projects, respectively. In other words, it is understood that 40% of total signed contracts came from these two counties. Consequently, in terms of the development of animal husbandry, Aydın has obtained 37 animal production and 13 animal processing facilities via seven calls by the IPARD-I program.

**Keywords:** ARDSI, Aydın, Broiler, Meat, Milk.

### IPARD Programının Aydın İli Hayvancılığı Üzerine Etkileri

**Özet:** Bu çalışmanın ilk amacı Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu (TKDK) tarafından yönetilen IPARD destek paketinden işletmelerin yararlanma düzeylerinin sektör ve ilçeler temelinde incelenmesidir. İkinci olarak süt ve et işleme tesisleri dışında kalan 37 işletmenin işletme düzeyindeki incelemelerine geçilerek işletmelerin işleyiş ve yapısal durumlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma toplam 37 süt, besi sığırcılığı ve etlik piliç işletmesinin anketler ile temin edilen verileri ile gerçekleştirilmiştir. Aydın hayvancılığına IPARD destekleri ile 9-15. çağrı dönemleri arasında arı yetiştiriciliği hariç olmak üzere toplam 54536884,28 TL yatırım yapıldığı hesaplanmıştır. Süt üretiminin 22328683.05 TL (%40,9) ile desteklemelerde lider olduğu hesaplanmıştır. Bu miktardan en büyük payı Germencik ve Yenipazar, en küçük payı Karpuzlu ve Sultanhisar İlçe'lerinin aldığı saptanmıştır. İmzalanmış sözleşme sayısına bakıldığında ise en fazla projenin Yenipazar ve Efeler İlçe'lerinden sırasıyla 10 ve 9 proje ile geldiği tespit edilmiştir. Diğer bir anlatımla İl genelindeki toplam projelerin %40'ının bu iki ilçeden çıktığı anlaşılmaktadır. Sonuç olarak Aydın, hayvancılığın kalkınması anlamında IPARD-I kapsamında yedi çağrı ile 37 hayvansal ürün üretim ve 13 hayvansal ürün işleme tesisine kavuşmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Aydın, Et, Etlik Piliç, Süt, TKDK.

### Introduction

IPA (Instrument for Pre-Accession Assistant) means an instrument for distributing of the financial supports in Turkey during the 2014-2020 years in the context of European Union (EU) membership process. IPARD is also a rural development component of Instrument for Pre-Accession Assistant formed to provide financial support for members and nominees to be member countries by EU (Celiktaş, 2006). Agriculture and Rural Development Support Institution was formed to deal with mentioned support issues in 2007 in Turkey. After the first phase, Aydın was added to the second phase of the support package. Out of 165, 117 projects were accepted for a grant between 2013-2015 years according to the financial support package that entered into force on 27/01/2015 (Anonymous, 2006; Anonymous, 2018). European Commission approved the IPARD program

on 25/02/2008. Turkey got started on legal regulations about financial support within the eighth Five Years Development Plan dealing with this issue. Along with the full membership procedure, the importance of rural development was gained momentum (Aydın and Yildirim, 2013; Can and Esengün, 2007; Karatas, 2010). EU has three main equities for financial support programs. Traditional equities (basically consisting of custom levies and agriculture and sugar tax), revenues from VAT, and some parts of national incomes of member countries are acceptable for primary financial resources. Other incomes consist of penalties by EU-related associations, incomes related to EU activities, stoppages from EU employees, and special payments from member states (Karatas, 2010; Zulfuoglu, 2011). Among the other nine countries, it could be said that Turkey



has taken nearly half of the financial supports (4795 million €) by population and geographical size. In general, the share of rural development in total EU financial supports was 17.8%, and the financial supports to Turkey were increased to 4795.2 million € in 2013 from 497.2 in 2007.

The first aim of this study was to investigate the effects of the IPARD program on animal husbandry in Aydin by sectors and counties. The second was to evaluate the management and structural status of the 37 farms apart from milk and meat processing units working on meat and milk production with routine farm visits.

## Material and Methods

In the application made to the Animal Ethics Committee of Aydin Adnan Menderes University for the study, written information was received that no approval was required since experimental animals were not used.

The material of the study consisted of data collected with a face-to-face questionnaire from a total of 50 holdings that had been accepted for a grant (24 milk production, 11 milk processing, ten broiler productions, three beef production, and two beef processing) between June 2018 and June 2019. Apart from meat and milk processing holdings, 37 holdings (milk, meat, and broiler production facilities) were individually visited in terms of their structural and management status. In comparison milk production farms were sorted as small (9), medium (7), and big (8) as to their animal capacities; beef production farms were not sorted because of low (3) farm numbers. Milk and meat processing units were added to the study only for their amount of financial support, and therefore there was no other evaluation about these holdings. Data were analyzed with SPSS for descriptive statistics, and results were presented as tables.

## Results

In the meaning of development in animal husbandry, Aydin has obtained 37 animal production and 13 animal processing facilities via seven calls by the IPARD-I program (Table 1). The share of milk production in terms of contract numbers was 48%, while meat processing has only 4% share. The share of milk production in its production field was also high (64.9%). As to support amounts, the share of milk production with 22328683.05 TL was also high (40.9%). However, the situation in broiler and beef production was quite different. So, while the share of broiler production in contract numbers was calculated as

20.0%, it is determined that this share decreased to 2.7% when it came to money taken. In contrast, it is seen that 6.0% of the share of beef production in contract numbers increased to 18.0% in the amount of money distributed. In general, it can be said that three out of four supports were allocated to milk-related businesses.

In general, it is determined that ARDSI signed a total of 10698 contracts and transferred 1148933450 € to business activities (agricultural and non-agricultural) between 9-15<sup>th</sup> calls by the IPARD-I program (Table 2). As to the share of animal husbandry in this amount of money, it is determined that 12 counties have benefitted from 54536884.28 TL support, and the highest (21.17%) and the lowest (0.79%) supports were for Germencik and Karpuzlu, respectively (Table 3). Yenipazar was the leader in terms of supported project numbers (10 projects), while Karpuzlu (only one project) and Buharkent (only one project) were at the bottom. The distribution of sectors' support showed that dairy farming was the leader with 24 projects, and beef production was at the lowest with three projects. It is determined that support for beef processing was only given to Efeler with two projects.

Findings related to farm buildings, land assets, and machinery are given in Table 4. It is seen that small dairy farms have no quarantine box, barn, feed silo, dining hall, or workplace. It is determined that one out of 9 small farms have a birth lodge, and two have calves box. There was no birth lodge, and calves box in three beef production farms.

Because of its characteristics (In general, poultry houses are occupy nearly 80-90% of the total farmland.), only land assets of dairy farms and beef production farms were investigated. According to the farm scales, it is revealed that small (40-50 heads), medium (51-100 heads), and big (over 100 heads) farms have 42.3, 87.9, and 220.8 da land assets on average, respectively (Table 4). During the routine visits, farm owners declared that nearly 80% of land assets belonged to them. In terms of land usage, many farm owners declared that they were using their lands for their businesses. It is also revealed that corn was essential in animal nutrition for small (30.4 da), medium (61.5 da), and big (174.7 da) scale farms for both milk and beef production (Table 4).

It is revealed that farms used different types of equipment with an increasing trend for their professions as parallel to farm-scale (Table 4). It is determined that all the farms have a lot of tractors and silage machines. It is also observed that there were no big machines such as the loader, separator, truck, or tanker in medium and small scale-farms.

**Table 1.** The number, sector, and support amounts of farms.

Sector	Scale	Number	% in field	% in total	Amount (TL)	%
Milk production	40-50 head	9				
	51-100 head	7				
	101 and over head	8				
		24	64.9	48.0	22328683.05	40.9
Broiler	50000 head	10	27.0	20.0	1466382.49	2.7
Beef production	115 head	3	8.1	6.0	9822231.39	18.0
Total		37	100.0			
Milk processing		11	84.6	22.0	18296891.38	33.6
Meat processing		2	15.4	4.0	2622695.97	4.8
Total		13	100.0			
Grand total		50		100.0	54536884.28	100.0

**Table 2.** The number of contracts signed and support amounts (€).

Call numbers	Contract numbers	EU	Turkey	ARSDI (EU+Turkey)
9	981	79750020.99	26583348.28	106333369.27
10	417	21895530.86	7298513.54	29194044.40
11	4.530	176867608.33	58955871.98	235823480.31
12	1.679	238935719.46	79645241.54	318580960.99
13	2.318	127419312.12	42473106.14	169892418.26
14	484	138099933.15	46033311.48	184133244.63
15	289	78731948.68	26243983.22	104975931.91
Total	10698	861700073.61	287233376.25	1148933450.00

**Table3.** Financial supports by counties and sectors (TL).

County	Sectors	N of farm	supported	Financial support	Total support for county	Share in province (%)
İncirliova	Milk prod.*	2		2128266.76		
	Broiler prod.	1		1075923.30	4216008.41	7.73
	Milk proc.**	1		1011818.35		
Germencik	Broiler prod.	2		1666901.02		
	Beef prod.	2		1448088.70	11546396.61	21.17
	Milk proc.	2		8431406.89		
Cine	Milk prod.	4		2606892.26		
	Broiler prod.	1		1704201.00	5070872.28	9.30
	Milk proc.	1		759778.32		
Kuyucak	Milk prod.	2		2377891.12		
	Milk proc.	2		2551385.12	4929276.24	9.04
Karpuzlu	Milk prod.	1		430999.40	430999.40	0.79
	Broiler prod.	1		1490204.23	2354964.67	4.32
Bozdoğan	Milk prod.	1		604533.73		
	Broiler prod.	1		1490204.23	2354964.67	4.32
Kosk	Milk prod.	1		260226.71		
	Broiler prod.	1		868307.00	868307.00	1.59
Efeler	Broiler prod.	3		2162070.71		
	Beefprod.	1		48293.79		
	Milk proc.	2		412049.48	5245109.95	9.62
	Meat proc.	2		2622695.97		
Yenipazar	Milk prod.	9		8415161.31		
	Milk proc.	1		2386045.77	10801207.08	19.81
Sultanhisar	Milk prod.	1		493171.04	493171.04	0.90
	Soke					
Soke	Milk prod.	3		4074369.79		
	Broiler prod.	1		3484180.74	7558550.53	13.86
	Milk proc.	1		854624.13		
Buharkent	Milk prod.	1		1022021.07	1022021.07	1.87
Total		50		54536884.28		100.00

\*: production, \*\*: processing unit.

**Table 4.** Building, land (da), and machinery assets of farms by scales.

Milk production	Birth lodge	Calve box	Quarantine box	Barn	Feed silo	Dining hall	Work place
Small	1	2	-	-	-	-	-
Medium	3	4	-	5	3	-	-
Big	7	8	5	8	8	2	2
Beef production	-	-	1	1	1	1	1
Milk production	Average Land	Corn	Barley	Vetch	Triticale	Fodder beet	Trefoil
Small	42.3	30.4	25.2	11.8	7.5	10.1	4.5
Medium	87.9	61.5	50.8	32.2	14.9	21.9	18.3
Big	220.8	174.7	120.5	50.5	35.8	40.6	65.9
Beef production	77.3	55.0	41.3	-	-	-	12.8
Milk production	Tractor	Loader	Manure facility	Feed unit	Truck	Tanker	Silage machinery
Small	9	-	-	-	-	-	5
Medium	7	-	-	-	1	2	2
Big	8	5	3	5	7	8	3
Beef production	3	1	1	1	1	1	-

Results related to the labor force, education status of owners and/or managers, and ownership of farms were given in Table 5.

It is observed that 11 out of 24 farms (45.8 %) have one person for dairy farm activities, while beef production farms have more than one person. However, it is seen from the table that broiler farms use one or two-person as a labor force. It is determined that half of the dairy farm owners

and/or managers were graduated from university while none of the beef producers were elementary school graduates. The main occupation of owners and/or managers was found high in support of 'Yes' (62.5%). Insurance policy for social security was determined as 58.3% in dairy farms while 80.0% in broiler farms. It has been determined that 58.3% of dairy farms, 50% of broiler farms, and 33.3% of beef farms have legal personalities.

**Table 5.** Findings related to labour force.

		Milk production	%	Beef production	%	Broiler production	%
Labour force	1 person	11	45.8	-	-	8	80.0
	2 person	4	16.7	1	33.3	2	20.0
	More	9	37.5	2	66.7	-	-
Education of the owner and/or manager	Elementary	7	29.2	-	-	2	20.0
	Secondary	5	20.8	1	33.3	3	30.0
	University	12	50.0	2	66.7	5	50.0
Main Occupation	Yes	15	62.5	3	100.0	4	40.0
	No	9	37.5	-	-	6	60.0
Insurance	Yes	14	58.3	2	66.7	8	80.0
	No	10	41.7	1	33.3	2	20.0
Entity	Natural	10	41.7	2	66.7	5	50.0
	Legal	14	58.3	1	33.3	5	50.0

## Discussion

IPARD program was a milestone in leaving fusty financial support systems in Turkey and Aydin as well. Aydin has gained momentum in terms of the developments in animal husbandry with IPARD. Apart from the older versions, in this brand-new support approachment, money was released gradually according to the level of construction. There was a five-year-long routine control period

after the establishment. Furthermore, these modern animals producing and processing units took huge attention from neighboring farms and holdings, and it has been a role model for other farms. In a study conducted in Kutahya, it is understood that ten projects on dairy production were supported via four calls in terms of the IPARD-I program. The authors stated that these farms' total additional broiler production capacity had reached 2.4 million heads (Unal and Fidan, 2014). At this point, it should be noted that productivity and

efficiency in these farms were significantly increased. Due to its comprehensive structure, the IPARD support system positively effects on people living in rural areas. In this regard, there were various rural supports related to non-agricultural sectors for socio-economic balance in rural areas (Isık and Baysal, 2011). IPARD has also transferred the complete control to the member countries for better monitoring. Before the IPARD, there was no adequate control mechanism and monitoring in any support program in Turkey (Olgun and Sevilmiş, 2017; Ozkul and Bozkurt, 2019). With this momentum, it is believed that supported and unsupported farms will reach EU standards in animal care, animal health, animal welfare, public health, and food safety (Aydın and Yildirim, 2013). However, as in every new system setup, there were so many problems related to bureaucracy at the beginning. In this sense, Koc and Giray (2015) reported an essential need for an information desk for preparing the projects and implementing those in the sector. It is understood that inadequate communication between Turkey and the EU also caused significant importation problems and mortality aroused from prolonged importation procedures.

Many of the managers and/or owners were university graduates, and one or two of them were also Veterinarians. In a study, Karacor et al. (2019) stated that the average age of owners was 40, education status was generally university degree, 61.5% of owners were experts in their businesses, 69.2% of them were economists, and all of them were males. In a similar study, Ozkul and Bozkurt (2019) reported that 80.7% of 166 farm owners were between 30 and 50 years old, 77.1% had lycee degrees. The entity status of farms showed similarities to the other studies, and there was an increasing trend for the legal entity. This situation was widespread, especially in meat and milk processing units which require so many investments. In a study on the meat sector in Konya, Karacor et al. (2019) stated that 19.2% of farms established in Konya belonged to nature entities. Authors expressed that 30.8% of farms were corporations, and 69.3%, had business experience less than five years. Özkul and Bozkurt (2019) reported that 34% of farms have legal entities, and 33.9% have professional managers in Isparta. Cimen (2017) reported that financial supports positively affect employment and enhance the working and living conditions in rural areas to approximately 90%. In parallel to these findings, there were brand new shelters for workers almost all Aydın farms. Data from ARDSI revealed that productivity increased at least 50% in the 80% of supported broiler and dairy farms (TKDK, 2015).

Gulcubuk et al. (2016) stated that 96.2% of dairy farms and 70.0% of beef-producing farms have an increase in productivity up to 50%. Authors reported that 5% of beef-producing farms and none of the dairy farms expressed no change in productivity. The authors also stated that financial supports have positive effects on marketing channels up to 72.3%. Cimen (2017) reported that all supported farms decreased their production costs and 53.3% of them invested in their sector, and 40% of them increased their scale.

Consequently, contributions to animal husbandry via IPARD verified with this study were essential for increasing production and employment in Aydın. At least, it is thought that this program was a good chance for new entrepreneurs who were reluctant to enter the animal production sector.

### Acknowledgements

This manuscript was compiled from the project supported by Aydın Adnan Menderes University Research Projects Unit (Project Number: VTF-17006)

### References

- Anonymous, 2006: Katılım Öncesi Yardım Aracı Kırsal Kalkınma (IPARD) Programı 2007-2013, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara.
- Anonymous, 2018: Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu İmzalanan Sözleşmeler Listesi, <http://tkdk.gov.tr/Projelismeler/ImzalananSozlesmeler>. Date of access: 11.02.2019
- Aydın Hİ, Yıldırım H, 2013: Kırsal Kalkınmanın Yeniden Yapılanması Sürecinde Yerel Aktörler: Bölgesel Kalkınma Ajansları – Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu, *Küresel İktisat ve İşletme Çalışmaları Derg*, 4: 28-42.
- Can M, Esengün K, 2007: Avrupa Birliği Kırsal Kalkınma Programlarının Türkiye'nin Kırsal Kalkınması Açısından İncelenmesi: SAPARD ve IPARD Örneği. *Gazi Osman Paşa Üniv Zir Fak Derg*, 24: 43-56.
- Çelikaş İ, 2006: Avrupa Birliği katılım öncesi fonlarının yapısı. *Sayıştay Derg*, 63: 39-49.
- Çimen AO, 2017: IPARD programının kırsal alanda ekonomik kalkınmaya ve yararlanıcılara katkıları ve beklentiler üzerine bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniv Fen Bil Ens, Ankara.
- Gülçubuk B, Köksal Ö, Ataseven Y, Gül U, Kan M, 2016: Kırsal Kalkınma Desteklerinin UlusalDüzeyde Etkileri: Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu (TKDK) Projelerinin İncelenmesi. *TEAD*, 2: 1-10.
- Isık N, Baysal D, 2011: Avrupa Birliği'ne Uyum Sürecinde Türkiye'de Kırsal Kalkınma Politikaları: Genel Bir Değerlendirme. *CÜ İkt ve İdr Bil Derg*, 1: 165-186.
- Karacor Z, Güvenek B, Öztürk H, Akçıl K, 2019: İpard desteklerinin sektörel etkileri: Konya Etsektörü örneği.

- <https://www.researchgate.net/publication/333133022>. Date of access: 12.03.2020.
- Karataş H, 2010: Avrupa Birliği katılım öncesi mali yardımları. Ümit Ofset Matbaacılık, Ankara.
- Koç A, Giray FA, 2015: AB Kırsal Kalkınma Mali Yardımı (Ipard): Türkiye Uygulaması ve Yeni Dönem (2014-2020) değişiklikler. *Akad Bak Derg*, 51: 314-331.
- Olgun FA, Sevilmiş G, 2017: AB Katılım Öncesi Yardım Aracı Kırsal Kalkınma Programı (IPARD) ve Türkiye Açısından Değerlendirilmesi. *Tarım Ekon Derg*, 23: 25-36.
- Özkul G, Bozkurt AA, 2019: Kırsal kalkınmada TKDK'nın rolü: IPARD programına ilişkin Isparta İli'nde bir inceleme. *SDÜ Vizyoner Derg*, 25: 536-554.
- Ünal S, Fidan A, 2014: Tarımsal destek uygulamaları: Ipard desteklerinin Kütahya tarımına etkisi. *Dumlupınar Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi*, Özel sayı: 63-75.
- TKDK, 2015: Kırsal Kalkınma Çalıştayı TKDK – D8 Ülkeleri, 14-15 Mayıs 2015, Ankara.
- Zülfüoğlu Ö, 2011: Avrupa Birliği Bütçesi ve 2007-2013 Mali Perspektifi İzdüşümünde 2011 Bütçesi Üzerinde Bir Değerlendirme. *Çimento İşveren Derg*, 4: 20-34.

**\*Correspondence:** M. Kenan TÜRKYILMAZ

Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Science, 09016, İsikli, Aydın, Turkey.

**e-mail:** mkturkyilmaz@adu.edu.tr

## Isolation of Methicillin Resistant (MR) Staphylococci from Chicken Meat Samples

Özkan ASLANTAŞ<sup>1,a,\*</sup>, Nejla YILDIRIM<sup>1,b</sup>

<sup>1</sup>Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Hatay, Turkey  
<sup>a</sup>ORCID:0000-0003-0407-8633, <sup>b</sup>0000-0003-3509-410X

Geliş Tarihi: 28.06.2021

Kabul Tarihi: 19.10.2021

**Abstract:** The aim of this study was to determine the presence of methicillin resistant staphylococci (MRS) in retail raw chicken meat samples sold in Hatay. The antimicrobial susceptibility of the isolates was tested for 13 different antimicrobials by disc diffusion method and investigated for resistance genes encoding methicillin (*mecA*), tetracycline (*tetM*, *tetK*), penicillin (*blaZ*), macrolide (*ermA*, *ermC*), lincosamide (*lnuA*) and aminoglycoside [*aac(6'')/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*] resistance via the use of polymerase chain reaction (PCR). In addition, the presence of staphylococcal enterotoxin (SE) genes was also searched by PCR. Out of 50 collected chicken meat samples, 11 (22%) MRS was isolated and the following species were determined: *S. sciuri* (72.7%, 8/11) and *S. epidermidis* (27.3%, 3/11). While all isolates were resistant to oxacillin, penicillin and ampicillin, various rates of resistance were observed for tetracycline (8, 72.7%), clindamycin (3, 27.3%), trimethoprim-sulfamethoxazole (2, 18.2%), erythromycin (2, 18.2%) and rifampicin (1, 9.1%). All MRS harbored *mecA* gene together with *blaZ*. The *tetM* gene responsible for ribosomal protection was detected in all phenotypically tetracycline resistant isolates. *ermC* gene in erythromycin resistant isolates and *lnuA* gene in clindamycin resistant isolates were detected. None of the isolates was found to be positive for SE genes. The results of this study indicated that contamination of retail raw chicken meat samples with MRS poses a risk to public health due to transmission of these bacteria to humans. Additionally, this study also highlights the importance of monitoring antimicrobial resistant bacteria in animal originated foods.

**Key words:** Chicken meat, Methicillin resistance, Staphylococci.

### Tavuk Eti Örneklerinden Metisiline Dirençli (MR) Stafilokok İzolasyonu

**Özet:** Bu çalışmanın amacı Hatay'da satılan 50 perakende çiğ tavuk eti örneğinde metisiline dirençli stafilokok (MRS) varlığının araştırılması idi. İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle 13 farklı antimikrobiyal için test edildi ve metisilin (*mecA*), tetrasiklin (*tetM*, *tetK*), penisilin (*blaZ*), makrolid (*ermA*, *ermC*), linkozamid (*lnuA*) ve aminoglikozid [*aac(6'')/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*] direncine aracılık eden genler yönünden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile incelendi. Ayrıca, stafilokokal enterotoksin (SE) genlerinin varlığı da PCR ile araştırıldı. İncelenen 50 perakende çiğ tavuk eti örneğinin 11'inden (%22) MRS izole edildi ve bu izolatların 8'i (%72.7) *S. sciuri* ve 3'ü (%27.3) de *S. epidermidis* olarak tanımlandı. Tüm izolatlar oksasilin, penisilin ve ampisiline dirençli iken tetrasiklin (8, %72.7), klindamisin (3, %27.3), trimetoprim-sülfametoksazol (2, %18.2), eritromisin (2, %18.2) ve rifampisine (1, %9.1) farklı direnç oranları gözlemlendi. Tüm MRS izolatları *blaZ* ile birlikte *mecA* genini taşıdı. Fenotipik olarak tetrasiklin dirençli izolatlarda ribozomal korumadan sorumlu *tetM* geni tespit edildi. Eritromisine dirençli izolatlarda *ermC* geni ve klindamisine dirençli izolatlarda *lnuA* geni saptandı. İzolatlar SE genlerinin varlığı açısından negatif bulundu. Bu çalışmanın sonuçları, perakende çiğ tavuk örneklerinde MRS'nin varlığının, antibiyotik direncinin insanlara olası yayılması nedeniyle halk sağlığı açısından önemli olabileceğini göstermiştir. Ayrıca bu çalışma, hayvansal kaynaklı gıdalarda antimikrobiyal dirençli bakterilerin izlenmesinin önemini de vurgulamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Tavuk eti, Metisilin direnci, Stafilokok.

### Introduction

To date, 73 species and 30 subspecies have been described within the *Staphylococcus* genus (<https://www.bacterio.net/genus/staphylococcus>). Staphylococci are ubiquitous agents that reside on the skin and mucous membranes of humans and animals (Tong et al., 2015). Based on coagulase activity, the staphylococci are classified into 2 major groups as coagulase-positive staphylococci (CoPS) and coagulase-negative staphylococci (CoNS) (França et al., 2021). Although CoPS, especially *S.*

*aureus*, are recognized as important pathogens in humans and animals, CoNS have increasingly gained importance due to the involvement of these agents in a wide spectrum of opportunistic infections in humans and animals (Becker et al., 2014). Over two decades, the emergence and spread of antimicrobial resistance have become one of the biggest threats to public health due to making treatment of bacterial infections very limited (Prestinaci et al. 2015). The members of the genus

Staphylococcus are able to acquire and transfer resistance genes through mobile genetic elements (MGEs) (Bitrus et al., 2018). The methicillin resistance in staphylococci is mostly related to *mecA* gene carried by a MGE named the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) (Rolo et al., 2017). The methicillin-resistance among CoNS has been proposed to be an important issue due to being a potential reservoir of SCC*mec* elements for *S. aureus* (Hanssen and Ericson Sollid, 2006).

It has been demonstrated that raw chicken meat is important food vehicles of foodborne pathogens and antimicrobial resistant bacteria (Martins et al., 2013; Pehlivanlar Önen et al., 2015; Yılmaz et al., 2016; Özdemir and Keyvan, 2016; Can et al., 2017; Dekker et al., 2019). It has been reported that the mechanisms responsible for antimicrobial resistance observed in CoNS strains are the same as those observed in *S. aureus* strains (Osman et al., 2017). On the other hand, the increasing rates of methicillin resistance observed among CoNS strains have led to re-evaluation of these agents for food safety perspective (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2015). Therefore, it was aimed to evaluate the occurrence of MRS in the chicken retail meat marketed in Hatay.

## Materials and Method

**Collection of samples:** A total of 50 retail chicken meat samples were randomly collected from various butcher shops and markets in Hatay province and its towns in one visit, between May and June in 2021. The samples were transported to the laboratory in well-sealed containers at +4°C immediately after collection.

**Isolation and identification of staphylococci:** The samples were enriched in Tryptic Soy Broth (TSB) supplemented with 10% NaCl at 37 °C for 24 h (Bhargava and Zhang, 2014). Then, 10 µl of inoculum was plated on Mannitol Salt agar (MSA) supplemented with cefoxitin (4 µg/ml) and incubated aerobically at 37 °C for 24 h (Smith and Kahlmeter, 2005). The colonies that were indicative of staphylococci from each sample were taken and passaged to Blood Agar that was supplemented with 5% defibrinated sheep blood for further biochemical tests. The isolates were identified as previously described phenotypic (Gram staining, catalase, coagulase test) (Koneman et al., 1997), and genotypic methods via PCR amplification using primers targeting 16S rRNA (Staphylococcus genus specific), *nuc* (*S. aureus* species specific), *sodA* (*S. chromogenes*, *S. haemolyticus* species specific), *gap* (*S. arlettae*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* species specific) and *rpoB* (*S. epidermidis*, *S. xylosus*,

*S. fluerettii* species specific) (Kim et al., 2001; Strommenger et al., 2003; Preethirani et al., 2015).

**Antimicrobial susceptibility testing:** The MR-CoNS were tested for susceptibility to penicillin (10 U), oxacillin (1 µg), tetracycline (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), rifampicin (5 µg), clindamycin (2 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (23.75/1.25 µg) and erythromycin (15 µg), using disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute criteria (CLSI, 2021). *S. aureus* ATCC 29213 was used as quality control.

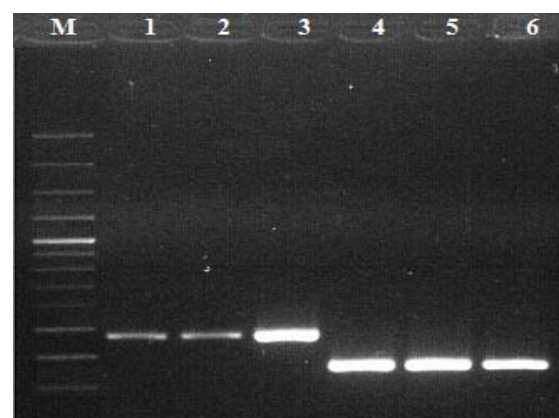
**Detection of antimicrobial resistance genes:** Antimicrobial resistance genes related to penicillin (*blaZ*), methicillin (*mecA*), aminoglycoside [*aac(6')-Ia*, *aph(2'')-Ia*, *ant(4')-Ia* and *aph(3')-IIIa*], tetracycline (*tetM*, *tetK*), macrolide (*ermA*, *ermC*) and clindamycin (*InuA*) were investigated as previously reported by Olsen et al. (2006), Choi et al. (2003), Strommenger et al. (2003), and Lina et al. (1999) using PCR assay.

**SCC*mec* typing:** A multiplex PCR strategy for SCC*mec* types was used as previously described by Kondo et al. (2007).

**Detection of SE genes:** Presence of five classical (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*) and 12 newly (*seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq* and *selr*) identified SE genes in the isolates were investigated using a series of mPCR (Omoe et al. 2013).

## Results

**Isolation and identification results:** Out of 50 chicken meat samples, 11 (22%) MRCoNS were isolated. Two species was identified in 11 isolates including eight *S. sciuri* and 3 *S. epidermidis* (Figure 1).



**Figure 1.** Agarose gel electrophoresis of *S. sciuri* and *S. epidermidis* isolates. Lane M: 100 bp molecular marker. Lane 1-3: *S. sciuri* (354 bp), Lane 4-6: *S. epidermidis* (466 bp).

**Antimicrobial susceptibility testing:** Zone diameter breakpoints for MR-CoNS and distribution

**Table 1.** Percentage of susceptibility, intermediacy or resistance for MR-CoNS isolates (n=11).

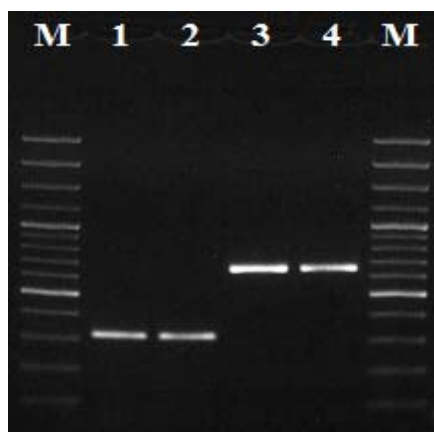
Antimicrobials	Disc content	Interpretation of zone diameters (mm)			No of MR-CoNS isolates		
		S $\geq$	I	R $\leq$	S (%)	I (%)	R (%)
Penicillin	10 U	29 $\geq$	-	$\leq$ 28	-	-	11 (100)
Oxacillin	1 $\mu$ g	18 $\geq$	-	$\leq$ 17	-	-	11 (100)
Tetracycline	30 $\mu$ g	19 $\geq$	15-18	$\leq$ 14	8 (72.7)	-	3 (27.3)
Chloramphenicol	30 $\mu$ g	18 $\geq$	13-17	$\leq$ 12	11 (100)	-	-
Ciprofloxacin	5 $\mu$ g	21 $\geq$	16-20	$\leq$ 15	11 (100)	-	-
Gentamicin	10 $\mu$ g	15 $\geq$	13-14	$\leq$ 12	9 (81.8)	-	2 (18.2)
Rifampicin	5 $\mu$ g	20 $\geq$	17-19	$\leq$ 16	9 (81.8)	1 (9.1)	1 (9.1)
Clindamycin	2 $\mu$ g	21 $\geq$	15-20	$\leq$ 14	5 (45.5)	2 (18.2)	4 (36.4)
Sulfamethoxazole-trimethoprim	23.75/1.25 $\mu$ g	16 $\geq$	11-15	$\leq$ 10	8 (72.7)	-	3 (27.3)
Erythromycin	15 $\mu$ g	23 $\geq$	14-22	$\leq$ 13	9 (81.8)	-	2 (18.2)

**Table 2.** Antimicrobial resistance phenotype, genotype and SCCmec type determined among MR-CoNS.

Species ID	SCCmec type	Resistance phenotype**	Resistance genotype
<i>S. epidermidis</i> 2	IV	OXA, P, TE	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>tetM</i>
<i>S. epidermidis</i> 24	NT*	OXA, P, TE, DA, RA	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>tetM</i> , <i>InuA</i>
<i>S. epidermidis</i> 26	NT	OXA, P, TE, DA	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>tetM</i> , <i>InuA</i>
<i>S. sciuri</i> 8	NT	OXA, P, TE, DA, SXT	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>tetM</i> , <i>InuA</i>
<i>S. sciuri</i> 23	NT	OXA, P, TE, E, SXT	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>tetM</i> , <i>ermC</i>
<i>S. sciuri</i> 25	III	OXA, P	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>tetM</i>
<i>S. sciuri</i> 28	NT	OXA, P, TE	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>tetM</i>
<i>S. sciuri</i> 31	V	OXA, P, TE	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>tetM</i>
<i>S. sciuri</i> 37	NT	OXA, P	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i>
<i>S. sciuri</i> 48	V	OXA, P, TE, E	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>tetM</i>
<i>S. sciuri</i> 49	NT	OXA, P	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i>

\*Non-typeable, \*\*OXA: oxacillin, P: penicillin, AM: ampicillin, TE: tetracycline, DA: clindamycin, RA: rifampicin, E: erythromycin, SXT: sulfamethoxazole/trimethoprim.

of zone diameters were given in Table 1. As seen in Table 2, all isolates showed resistance to penicillin, oxacillin and ampicillin. Various rates of resistance to tetracycline (8, 72.7%), clindamycin (3, 27.3%), trimethoprim-sulfamethoxazole (2, 18.2%), erythromycin (2, 18.2%) and rifampicin (1, 9.1%) were observed.



**Figure 2.** Agarose gel electrophoresis of *blaZ* and *mecA* genes. Lane M: 100 bp molecular marker. Lane 1-2: *mecA* (314 bp) positive isolates, Lane 3-4: *blaZ* positive isolates (675 bp).

**PCR detection of antimicrobial resistance and SE genes:** *tetM*, *blaZ* and *InuA* were detected in all tetracycline resistant-, penicillin resistant- and clindamycin resistant-isolates, respectively (Figure

2). Among erythromycin isolates, only one isolate had *ermC* gene (Table 1). None of the isolates had SE genes.

**SCCmec typing:** SCCmec types were determined in only four isolates (Table 1). Seven isolates were not assigned to any SCCmec type. These seven isolates consisted of two *S. epidermidis* and five *S. hyicus*. While three of the untypeable isolates carried only one of the *mec* complex genes, two of them carried at least one *ccr* complex gene; no amplification was observed in two isolates.

## Discussion

Contaminated chicken meat is an important source of transmission of both zoonotic and antimicrobial resistant bacteria (Abebe et al., 2020; EFSA, 2021). The clinical and epidemiologic importance of CoNS, especially MR-CoNS have been increasingly documented in recent years, and therefore, role as potential foodborne pathogens, should not be overlooked due to public health perspective (Chajicka-Wierzchowski et al., 2014; Bhargava and Zhang, 2014; Osman et al., 2016; Lee et al., 2020). Of the 50 samples inspected, 11 MR-CoNS belonging to two species were isolated (Table 1), of which *S. sciuri* (8/11) was the most dominant species. Huber et al. (2011) detected MR-CoNS in 48.2% of chicken carcasses and found *S. lentus* as



the predominant species. Bhargava and Zhang (2014) isolated MR-CoNS from 7.9% (6/79) of chicken meat samples and identified these isolates as *S. fleuretti* (3), *S. sciuri* (2) and *S. vitulinus* (1). Igbinosa et al. (2016) examined 30 raw chicken meat samples and isolated 10 *Staphylococcus* spp., consisting of 6 *S. aureus*, 3 *S. epidermidis* and 1 *S. xylosum*, found that all isolates were positive for *mecA* gene. Zogg et al (2016) investigated the occurrence of MRSA in 80 raw chicken samples (36 from Swiss and 44 imported from Germany), and isolated MRSA from only six (7.5%) of imported raw chicken meat samples. Possible contamination source of chicken meat with *S. sciuri* or *S. epidermidis* could have originated from broilers (Aslantaş, 2020) and humans (Vanderhaeghen et al., 2012). In previous studies conducted in Turkey, the presence of *S. aureus* was searched in raw chicken meat samples, but found that none of the isolates carried the *mecA* gene (Özdemir and Keyvan, 2016; Can et al. 2017).

Many researchers have emphasized that the widespread dissemination of *mecA* gene among CoNS species posed to emergence of novel methicillin-resistant staphylococcal lineages through acquisition and insertion of the SCCmec element into the chromosome of susceptible strains (Zhang et al., 2009; Tsubakishita et al., 2010; Zong et al., 2011; Otto, 2013). Although horizontal transfer of *mecA* gene is well understood, the transfer mechanism has not been fully elucidated (Tsubakishita et al., 2010). On the other hand, Hanssen and Ericson Sollid (2006) suggested that CoNSs combine the *mec* and *ccr* genes acquired from an unknown source and then transferred these genes to *S. aureus* (Hanssen and Ericson Sollid, 2006). While SCCmec type I, II, and III are predominantly found in hospital-acquired MRSA (HA-MRSA), SCCmec type IV and V are primarily detected in community acquired MRSA (Ünal, 2006). On the other hand, while SCCmec I, II, and III are rarely reported in MR-CoNS, SCCmec type IV and V are mostly detected in MR-CoNS. In previous studies, dominance of SCCmec type IV and V in MR-CoNS was reported, as observed in this study (Zhang et al., 2009; Fessler et al., 2010; Bhargava and Zhang, 2014; Silva et al., 2014). In this study, only one of the *S. epidermidis* isolates carried SCCmec type IV. It was particularly reported that *S. epidermidis* might be a reservoir of SCCmec type IV, and play an important role in horizontal transfer of SCCmec IVa to *S. aureus* (Wisplinghoff et al., 2003). Moreover, Barbier et al. (2010) and Jamaluddin et al. (2008) stressed that SCCmec IVa was prevalent in *S. aureus* and *S. epidermidis* isolates, and these two species carried SCCmec elements with a nucleotide identity of 98–99% to each other. In this study,

most of the isolates had untypeable SCCmec. Similar observation have also been reported by many researchers (Aslantaş, 2020; Nemeghaire et al. 2014; Bhargava and Zhang 2012), and regarded as indication of diversity of SCCmec types in MR-CoNS. This has been attributed to the development and use of currently available SCCmec typing schemes based on *S. aureus*. When these SCCmec typing schemes are applied, MR-CoNS couldn't have been typed due to two reason: (i) amplification failure of genetic variants of *ccr* and *mec* complex genes, and (ii) un-elucidated mechanisms and/or vectors other than SCC that allow the transfer of MR among staphylococci (Hanssen et al., 2004; Zhang et al., 2009).

Multi-drug resistance (MDR) among MR-CoNS has been well-documented in other studies (Nemeghaire et al., 2014; Chajęcka-Wierżchowska et al., 2015; Aslantaş, 2020). In this study, 45.5% (5/11) of the isolates exhibited the MDR phenotype defined as resistant to antimicrobials belonging to three or more classes. In a recent study, Aslantaş (2020) reported high prevalence of MDR methicillin resistant *S. sciuri* isolates among broiler flocks. The isolates revealed high level of resistance to tetracycline (72.7%) in concordance with previous studies (Chajęcka-Bhargava and Zhang, 2012; Wierżchowska et al., 2015; Aslantaş, 2020). Tetracycline resistance is usually mediated by genes encoding efflux proteins (*tetK*, *tetL*) or ribosomal protection proteins (*tetM*, *tetO* and *tetS*) (Huys et al., 2004). Of these genes, only *tetM* gene was detected in all tetracycline resistant isolates. This result is in agreement with the findings of Bhargava and Zhang (2012) and Chajęcka-Wierżchowska et al (2015). Bhargava and Zhang (2012) detected *tetM* in 64.3% of the investigated strains, Chajęcka-Wierżchowska et al. (2015) found *tetM* as the most frequent tetracycline resistance gene.

None of the isolates carried any SE genes. The absence or low prevalence of SE genes were previously reported among MR-CoNS. Nemeghaire et al. (2014) detected the *sed* gene in only one of the 71 MR-*S. sciuri* isolates. On the other hand, Aslantaş (2020) did not detect any SE genes among 63 MR-*S. sciuri* isolates.

To sum up, the results of the study showed that (i) retail raw chicken meat samples were contaminated with relatively high levels of MR-CoNS, (ii) MR *S. sciuri* and *S. epidermidis* isolates had a high rate of tetracycline resistance, associated with *tetM* gene and (iii) none of the isolates carried SE genes. Therefore, continuous surveillance is needed to monitor antimicrobial resistant bacteria and necessary precautions should be implemented to control transmission of antimicrobial resistant bacteria to humans.

## Funding

This work was supported by the Hatay Mustafa Kemal University Scientific Research Fund under Grant number of 20.M.02

## Kaynaklar

- Abebe E, Gugsu G, Ahmed M, 2020: Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. *J Trop Med*, 2020, 4674235.
- Aslantaş Ö 2020: High occurrence of methicillin resistant *Staphylococcus sciuri* (MRSS) and first detection of *mecC* from broiler flocks in Turkey. *Isr J Vet Med*, 75(4), 185-192.
- Barbier F, Ruppé E, Hernandez D, Lebeaux D, Francois P, Felix B, Desprez A, Maiga A, Woerther PL, Gaillard K, Jeanrot C, Wolff M, Schrenzel J, Andreumont A, Ruimy R 2010: Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 202, 270–281.
- Becker K, Heilmann C, Peters G 2014: Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*, 27(4), 870-926.
- Bhargava K, Zhang Y 2014: Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCoNS) in retail meat. *Food Microbiol*, 42, 56-60.
- Bitrus AA, Peter OM, Abbas MA, Goni MD 2018: *Staphylococcus aureus*: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms. *Vet Scie Res Review*, 4(2), 43-54.
- Can HY, Elmali M, Karagöz A 2017. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk, cheese, minced meat, and chicken meat samples. *Korean J Food Sci Anim Resour*, 37(2), 175-180.
- Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A, Nalepa B, Sierpińska M, Łaniewska-Trokenheim Ł, 2015: Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin--phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food Microbiol*, 46, 222-226.
- Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kang JH, Shin WS, Kang MW 2003: Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among staphylococcus species. *J Korean Med Sci*, 18, 631-636.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. 2021. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI Document M100-S31. Wayne, PA, USA.
- Dekker D, Eibach D, Boahen KG, Akenten CW, Pfeifer Y, Zautner AE, Mertens E, Krumkamp R, Jaeger A, Flieger A, Owusu-Dabo E, May J 2019: Fluoroquinolone-Resistant *Salmonella enterica*, *Campylobacter* spp., and *Arcobacter butzleri* from Local and Imported Poultry Meat in Kumasi, Ghana. *Foodborne Pathog Dis*, 16(5), 352-358.
- EFSA 2021: The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA J*, 19(4), 6490.
- Fessler AT, Billerbeck C, Kadlec K, Schwarz S 2010: Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother*, 65(8), 1576-82.
- França A, Gaio V, Lopes N, Melo LDR 2021: Virulence factors in coagulase-negative staphylococci. *Pathogens*, 10(2), 170.
- Hanssen AM, Kjeldsen G, Sollid JUE 2004. Local variants of staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 285-296.
- Hanssen AM, Ericson Sollid JU 2006: SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 46(1), 8-20.
- Huber H, Ziegler D, Pflüger V, Vogel G, Zweifel C, Stephan R 2011: Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. *BMC Vet Res*, 7, 6.
- Huys G, D'Haene K, Collard JM, Swings J 2004: Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in Enterococcus isolates from food. *Appl Environ Microbiol*, 70, 1555-1562.
- Igbino OA, Beshiru A, Akporehe LU, Oviasogie FE, Igbino OO 2016: Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococcus* Species in Raw Meat Samples Intended for Human Consumption in Benin City, Nigeria: Implications for Public Health. *Int J Environ Res Public Health*, 13(10), 949.
- Jamaluddin TZ, Kuwahara-Arai K, Hisata K, Terasawa M, Cui L, Baba T, Sotozono C, Kinoshita S, Ito T, Hiramatsu K. Extreme genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains disseminated among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol*, 46, 3778–3783.
- Kim CH, Khan M, Morin DE, Hurley WL, Tripathy DN, Kehrl M Jr, Oluoch AO, Kakoma I 2001: Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus nuc* gene in bovine milk. *J Dairy Sci*, 84(1), 74-83.
- Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K, 2007: Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 264-274.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Washington MD. *Staphylococci and Related Gram-Positive Cocci*. In Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 5th Ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins. 1997. p. 539-565.
- Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J 1999: Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and

- streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 1062-1066.
- Martins PD, de Almeida TT, Basso AP, de Moura TM, Frazzon J, Tondo EC, Frazzon APG 2013: Coagulase-positive staphylococci isolated from chicken meat: Pathogenic potential and vancomycin resistance. *Foodborne Pathog Dis*, 10, 771-776.
- Nemeghaire S, Vanderhaeghen W, Argudín MA, Haesebrouck F, Butaye P 2014: Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* isolates from industrially raised pigs, cattle and broiler chickens. *J Antimicrob Chemother*, 69, 2928-2934.
- Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM 2006: Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother*, 57, 450-460.
- Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K 2005: Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiol Lett*, 246(2), 191-198.
- Osman K, Alvarez-Ordóñez A, Ruiz L, Badr J, ElHofy F, Al-Maary KS, Moussa IMI, Hessain AM, Orabi A, Saad A, Elhadidy M 2017: Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from imported beef meat. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 16, 35.
- Otto M 2013: Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: Staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. *Bioessays*, 35(1), 4-11.
- Özdemir H, Keyvan E 2016: Isolation and characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from beef, sheep and chicken meat. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 63, 333-338.
- Pehlivanlar Önen S, Aslantaş Ö, Şebnem Yılmaz E, Kürekcı C 2015: Prevalence of  $\beta$ -Lactamase Producing *Escherichia coli* from Retail Meat in Turkey. *J Food Sci*, 80(9), M2023-9.
- Preethirani PL, Isloor S, Sundareshan S, Nuthanlakshmi V, Deepthikiran K, Sinha AY, Rathnamma D, Nithin Prabhu K, Sharada R, Mukkur TK, Hegde NR 2015: Isolation, Biochemical and Molecular Identification, and In-Vitro Antimicrobial Resistance Patterns of Bacteria Isolated from Bubaline Subclinical Mastitis in South India. *PLoS One*, 10(11), e0142717.
- Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A 2015: Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*, 109(7), 309-318.
- Rolo J, Worning P, Nielsen JB, Bowden R, Bouchami O, Damborg P, Guardabassi L, Perreten V, Tomasz A, Westh H, de Lencastre H, Miragaia M 2017: Evolutionary origin of the staphylococcal cassette chromosome (*SCCmec*). *Antimicrob Agents Chemother*, 6, e02302-16.
- Silva NC, Guimarães FF, de P Manzi M, Gómez-Sanz E, Gómez P, Araújo-Júnior JP, Langoni H, Rall VL, Torres C 2014: Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in milk from cows with mastitis in Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(2), 227-33.
- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W 2003: Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 41, 4089-4094.
- Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG 2015: *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*, 28, 603-661.
- Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K 2010: Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(10), 4352-4359.
- Vanderhaeghen W, Vandendriessche S, Crombe F, Dispas M, Denis O, Hermans K, Haesebrouck F, Butaye P 2012: Species and staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*) diversity among methicillin-resistant non-*Staphylococcus aureus* staphylococci isolated from pigs. *Vet Microbiol*, 158, 123-128.
- Ünal S 2006: Toplumda kazanılmış metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*. Genetik özellikler. *Ankem Derg*, 20, 100-101.
- Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W, Archer GL 2003: Related clones containing *SCCmec* type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 3574-3579.
- Yılmaz EŞ, Aslantaş Ö, Pehlivanlar Önen S, Türkyılmaz S, Kürekcı C 2016: Prevalence, antimicrobial resistance and virulence traits in enterococci from food of animal origin in Turkey. *LWT- Food Sci Technol*, 66, 20-26.
- Zhang Y, Agidi S, LeJeune J 2009: Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. *J Appl Microbiol*, 107(4), 1375-1383.
- Zogg AL, Zurfluh K, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. 2016: Characteristics of ESBL-producing Enterobacteriaceae and Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from Swiss and imported raw poultry meat collected at retail level. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 158(6), 451-456.
- Zong Z, Peng C, Lü X 2001: Diversity of *SCCmec* elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates. *PLoS One*, 6(5), e20191.

\*Correspondence: Özkan ASLANTAŞ

Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Hatay, Turkey.

e-mail: aslantas@mku.edu.tr

## Diatomitin Kilis Keçilerinin Kan Selenyum ve Çinko Değerleri ile Canlı Ağırlık Değişimlerine Etkileri

Mehmet Şevki ÇADIRCI<sup>1,a,\*</sup>, Mehmet İRİADAM<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>TOBB Fen Lisesi Müdürlüğü, Haliliye, Şanlıurfa, Türkiye

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-6311-7578, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-9694-6014

Geliş Tarihi: 01.07.2021

Kabul Tarihi: 01.11.2021

**Özet:** Diatomit genellikle çiftlik hayvanları için yem bileşeni ve aynı zamanda alternatif bir antelmintik olarak kullanılan organik yem katkı maddesidir. Bu çalışmada Kilis Keçilerinin rasyonlarına belli oranlarda katılan diatomitin kanda Selenyum (Se) ve çinko (Zn) değerleri ile keçilerin canlı ağırlıklarına olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada 18-42 aylık, erkek ve dişi, 23-50 kg ağırlığında 15 Kilis keçisi kullanılmıştır. Hayvanlar kontrol grubu, %5 ve %10 diatomit katkılı grup olarak 3 gruba ayrılmıştır. I. Kontrol grubunun rasyonlarına diatomit katılmamıştır. II. Gruptaki hayvanların rasyonlarına günlük kuru yem miktarının %5'i kadar ve III. Gruptaki hayvanların rasyonlarına günlük kuru yem miktarının %10'u kadar diatomit katılarak 8 hafta beslenmiştir. Yapılan çalışma sonunda serum Zn ve Se düzeyleri incelendiğinde, hayvanların rasyonlarına %5 ve %10 diatomit katılması ile Zn ve Se düzeylerinde anlamlı farklılıklar olduğu ve %10 diatomit katkılı yemle beslenen grubun Zn değerlerinin en yüksek olduğu ve %5'lik diatomit katkısının Se düzeyinde önemli artışa neden olduğu belirlenmiştir. Grupların canlı ağırlık artış ortalamaları sırasıyla 4, 6.2 ve 5,6 kg olarak belirlenmiş, %5 diatomit katkılı yemle beslenen grubun canlı ağırlık artışı diğer gruplardan daha fazla olduğu belirlenmiştir (p< 0.05). Sonuç olarak hayvanların rasyonlarına %5 diatomit katkısının kan Se düzeyini, %10 diatomit katkısının kan Zn değerini artırdığı bununla beraber kullanılan diatomitin her iki grupta da canlı ağırlık artışı sağladığı tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Canlı Ağırlık, Çinko, Diatomit, Kilis Keçisi, Selenyum.

### The Effects of Diatomite on Blood Selenium and Zinc Values and The Live Weight Changes in Kilis Goats

**Abstract:** Diatomite is an organic feed additive that is often used as a feed ingredient for livestock and an alternative anthelmintic. In this study, the effects of diatomite, which was added to the diets of Kilis goats, on selenium and zinc figures of the animals' blood and the live weight of goats were investigated. In the study, between 18-42 months old male and female 15 Kilis goats with weights between 23-50 kg were used. The animals were divided into three groups: the control group, 5% diatomite added group, and 10% diatomite added group. Diatomite was not added to the rations of the control group. Up to 5% of the daily dry feed amount of diatomite was added to the second group of animals' rations. Up to %10 of the daily dry feed amount of diatomite was added to the third group of animals' rations. All the animals were fed for eight weeks. At the end of the study, when serum Zn and Se levels were examined, it was determined that there were significant differences in Zn and Se levels with the addition of 5% and 10% diatomite to the rations of the animals. Especially the %10 diatomite contribution caused a significant increase in Zn, and 5% diatomite contribution caused a significant increase in Se levels. At the end of the study, the average live weight gain of the groups was 4 kg, 6.2 kg, and 5.6 kg, respectively. It was determined that the body weight gain of the group fed with 5% diatomite supplemented feed was higher than the other groups (p<0.05). Consequently, it was determined that adding %10 diatomite to the rations of the animals caused an increase in Zn levels, and adding %5 diatomite to the rations of the animals caused an increase in Se levels. Moreover, it was stated that adding diatomite provided an increase in the live weight of the animals.

**Keywords:** Diatomite, Kilis Goat, Live Weight, Selenium, Zinc,

### Giriş

Diatomit, diyatome olarak adlandırılan tek hücreli mikroskobik silisli alglerin suda ölmeleri sonucu hücre çeperlerinin tortul şeklinde birikmesiyle oluşan organik çökeltidir (Taş ve Çetin, 2012). Besi ve kümes hayvanı üretiminde besin katkı maddesi olarak diatomitin tahıl ambarlarında böcek kontrolü ve hayvanlarda parazit kontrolü, mineral kaynağı, absorpsiyon gibi farklı amaçlarla kullanımı

rapor edilmiştir. Diatomit genellikle koyun, keçi, sığır, kümes hayvanları ve diğer çiftlik hayvanları için yem bileşeni ve alternatif bir antelmintik olarak kabul edilir (Beltran ve Martin, 2016). Hayvan sağlığı ve beslenmesi için organik bir ürün olarak kabul edilen diatomit koyun, keçi ve diğer çiftlik hayvanları için alternatif doğal antelmintik olmasının yanında etkili bir büyüme destekleyici

olduğu da iddia edilmektedir (Martel-Kennes ve ark., 2016; Nkwana ve ark., 2019). Diatomitin hayvanlarda besin takviyesi olarak kullanılmasının, verim artışı ve gıda güvenliğine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Köster, 2013). Hayvanlarda yıkıcı ve zehirli tortuları emen etkili bir sindirim yardımcısı olmasının yanı sıra diatomit hayvanların performansını iyileştirmede önemli olan 14 çeşit iz element içerdiği bilinmektedir (Adebiyi ve ark., 2009; Emeruwa ve Anurudu, 2018). Esas olarak amorf silika olan diatomit (>%86 silikon) sağlık için bir tehlike oluşturmaz. Ayrıca diatomit %5 sodyum, %3 magnezyum, %2 demir, selenyum ve bakır gibi 14 değerli eser element içermektedir (Köster, 2013).

Besicilikte ve kümes hayvanı yetiştiriciliğinde gıda sınıfı diatomit için, böcek ve parazit kontrolü, mineralizasyon, absorpsiyon ve tahıl koruma gibi dört farklı kullanımı bulunmaktadır. Diatomitin, hayvan beslenmesi için organik bir ürün olduğu ve koyun, keçi gibi çiftlik hayvanları için etkili bir büyüme destekleyici ve alternatif doğal antelmintik olduğu bilinmektedir (Nkwana ve ark., 2019).

İz elementler, hayvanların günlük ihtiyaçlarının miligram veya mikrogram seviyesinde olan demir, bakır, manganez, çinko ve selenyum gibi mineraller olup, canlıda birçok yapısal, katalizleyici ve düzenleyici etkileri olduğu, ayrıca bağışıklık sistemi üzerinde de önemli katkıları olduğu bildirilmektedir (Dalı, 2018; Galyean ve ark., 1999). Cu, Zn ve Se gibi bazı iz elementler karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasında anahtar rol oynamalarının yanı sıra hücre solunum, DNA ve RNA replikasyonu ve serbest radikallerin yok edilmesinde rol oynadıkları bilinmektedir (Vázquez-Armijo ve ark., 2011).

Selenyumun başlıca fonksiyonları; reaktif oksijenlerin hücre membranına ve epitel hücrelere olası zararlarının engellenmesi, antikor sentezinin uyarılması, lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanması olarak tanımlanabilir. Bununla birlikte laktasyon döneminde hayvanda görülen mastitisin etkilerinin Se takviyesi ile azaldığı belirtilmiştir (Paksoy ve İriadam 2012; Smith ve ark., 1985).

Selenoproteinler, hücreleri serbest radikallerin verdiği zarardan korur, tiroit hormonlarının metabolizmasına katılır, üreme fonksiyonlarını kontrol eder ve nöroprotektif etki gösterir (Tórtora-Pérez, 2010; Zarczynska ve ark., 2013). Kuzularda görülen Beyaz Kas Hastalığı yem ve ana sütüyle alınan E vitamini ve selenyumun eksikliği ya da displazenter transport blokajı nedeniyle oluşur. Hastalıklı olan kuzuların kasları güçsüzdür, solunum güçlüğü çekerler ve annelerini ememediklerinden kolostrum alamayıp akut kalp yetmezliğinden kısa sürede ölürlür. Hastalık belirtileri görülen bu hayvanlar hastalığın ilk dönemlerinde E vitamini kombinasyonları ile tedavi edilebilirler (Avcı ve ark., 2000; Sugen ve Güneş, 2008; Tórtora-Pérez, 2010).

Dünyada da yaygın görülen bu hastalık ülkemizde Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgeleri için de önemli bir sorun oluşturmaktadır (Avcı ve ark., 2000).

Çinko özellikle; kas doku, kemik, kan, bezler, genital organlar, deri, kıl, yapağı ve tırnaklarda yoğun olarak bulunmaktadır ve hayvanlarda ortalama olarak 30 mg/kg çinko bulunur. Kan serumunda ortalama %100-200 µg çinko bulunduğu bildirilmektedir. Protein metabolizması, membran bütünlüğünün korunması, leptin ve tiroid hormonlarının aktivitesi ile insülinin sentezi ve immun sistemde görev alan çinko, metabolizmada önemli role sahiptir. Çinkonun antioksidan enzimlerin yapısında bulunması sebebiyle, serbest radikallerin hücreye vereceği zararı önlemek amacıyla yeme eklenmesi önerilmektedir (Durmuş ve Eryavuz, 2012; Dalı, 2018). Rasyona yüksek düzeyde çinko eklenmesi ile kuzularda canlı ağırlık artışı, sığırlarda immun sistemin uyarılması, süt üretimi artışı, tırnak hastalıklarında azalma olduğu bildirilmiştir (Patra, 2007).

Yadav ve arkadaşları 2016 yılında 12 barbar keçisiyle 60 gün süreyle deney grubundaki hayvanlara günlük 150 ppm çinko sülfat ve 0,50 ppm sodyum selenat (inorganik çinko ve selenyum) vererek yapmış oldukları çalışmada, ortalama kan glukoz seviyesi, ALT ve AST değerlerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir (Yadav ve ark., 2016).

Batı Afrika Cüce Koyunlarının diyetine %2.0 diatomit eklenmesi, kuru madde alımını arttırdığı ve laktasyon sırasında kilo kaybını azalttığı, ayrıca yeme % 4.0'lük diatomit katkısının günlük kilo artışı artırıldığı tespit edilmiştir (Emeruwa ve Anurudu, 2018). Domuzlarla yapılan bir çalışmada, diatomitin asıl bileşeni olan SiO<sub>2</sub>'in rasyona eklenmesiyle yem alımını ve ortalama günlük kazancı artırdığı belirtilmiştir (Martel-Kennes ve ark., 2016).

Bu çalışmada Kilis Keçilerinin rasyonlarına yem katkısı olarak belli oranlarda katılan diatomitin, kan Se (selenyum) ve Zn (çinko) düzeyleri ile canlı ağırlık artışına olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal Metod

Araştırmada Harran Üniversitesi Araştırma Uygulama çiftliğinde bulunan yaşları 18-42 ay arasında değişen ve canlı ağırlıkları 23-50 kg arasında 15 Kilis keçisi kullanıldı. Ticari firmadan temin edilen işlenmemiş diatomit hayvan yemlerine katılarak deney süresi boyunca tasarlanan programa uygun olarak tüm hayvanların düzenli olarak beslenmesi sağlandı. Deney grupları, her grup farklı yaş, ağırlık ve cinsiyette 5 hayvandan oluşacak şekilde 3 grup olarak belirlendi. I. Gruba (kontrol grubuna) normal yem ve su verildi; II. Gruba günlük

1,5 kg kuru yem miktarının %5'i olan 75 gr diatomit katkısı yapıldı; III. Gruba günlük 1,5 kg kuru yem miktarının %10'u olan 150 gr diatomit katkısı yapıldı. Gruplar oluşturulduktan sonra hayvanların canlı ağırlık tartımı yapıp farklı gruplar ayrı olacak şekilde farklı kısımlara yerleştirildiler. Sekiz hafta sonunda tekrar tartımları yapıldı.

Tüm gruplardaki hayvanlardan iz element analizleri için juguler venadan antikoagülansız tüplere alınan örnekler 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen serum örnekleri Eppendorf tüplerine aktarılarak -80°C'de muhafaza edildi. Hayvanların tartımı yapıp kayıt altına alındı.

Sekiz hafta boyunca her 15 günde 1 defa kan örnekleri alınıp iz element analizleri için 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen serum örnekleri Eppendorf tüplerine aktarılarak -80°C'de saklandı. Sekizinci haftanın sonunda tüm hayvanların tartımı yapıp kayıt altına alındı.

İz element analizi için numuneler 0,5 gr ile 1,5 gr tartılmış, üzerine 10 mililitre nitrik asit eklenip (Cem mars 5) mikrodalga cihazında 160°C 1600 Watt %100 güçte 40'süre ile çözme işlemine tabi tutuldu. Tüm numuneler 50 ml hacme tamamlandıktan sonra standart Perkin Elmer solüsyonu kullanılarak ICP-MS (Perkin Elmer Elan-DRC-e) cihazında iz element analizleri yapılmış ve her 10 analizden sonra standart okuma yapıldı. Se için kalibrasyon 1000 ppb, Zn için de 2000 ppb olarak belirlenmiş ve korelasyon katsayısı (R) minimum 0.999 olarak ayarlanmıştır.

Tüm veri analizlerinin değerlendirilmesinde Windows yazılımı için Minitab 17 paket programı kullanıldı. Veriler varyans eşitlik varsayımı için Levene testi ve normallik varsayımı için Shapiro Wilk testi ile istatistiksel olarak analiz edildi ( $p>0.05$ ). Zn ve Se elementlerinin zaman ve uygulamalarının ANOVA analizleri, anlamlı çıkan sonuçların gruplar arası farkları belirlemek için Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapıldı. Tüm testlerde önem derecesi  $p<0.05$ 'te hesaplandı.

## Bulgular

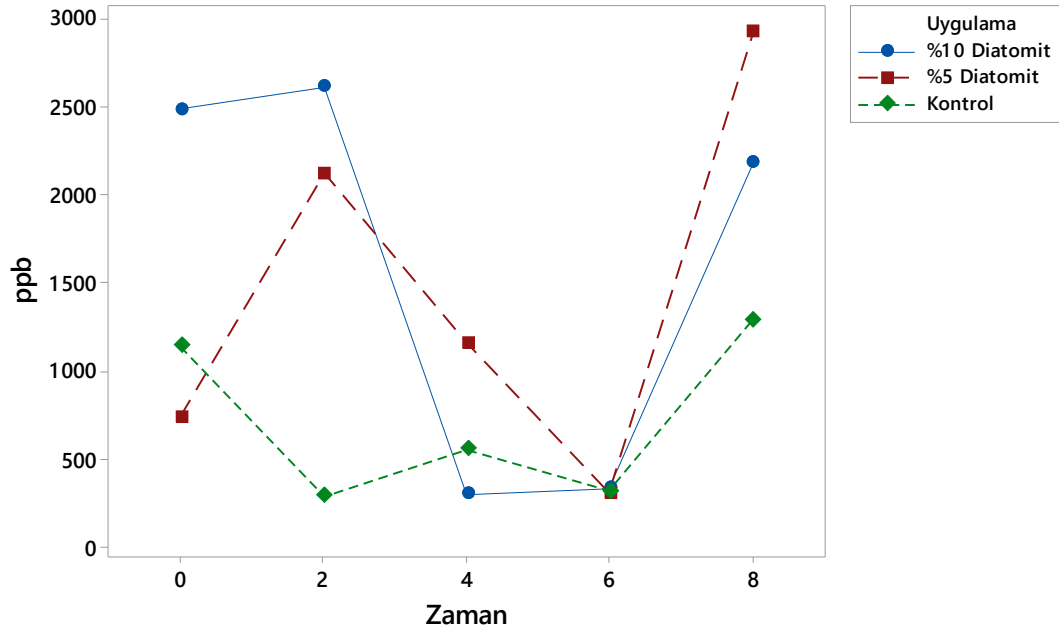
Zn ve Se bulguları değerlendirildiğinde başlangıçtan 8. haftanın sonuna kadar kontrol grubu, %5 ve %10 diatomit katkılı yemle beslenen gruplar için Zn ve Se değerlerinde anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Serum Zn ve Se değerleri kontrol grubu hayvanlarına göre artış göstermiştir ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu değerlerine göre %5 ve %10 diatomit katkılı yemle beslenen hayvanlarda Zn değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiş ve %10 diatomit katkılı yemle beslenen grubun Zn değerleri en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Se değerleri incelendiğinde ise %5 diatomit katkılı yemle beslenen hayvanların değerlerinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiş, %10 diatomit katkılı yemle beslenen hayvanların değerlerinin de kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 1:** Kontrol grubu, %5 ve %10 katkılı yemle beslenen grupların Zn ve Se ortalamaları (ppb, n=15).

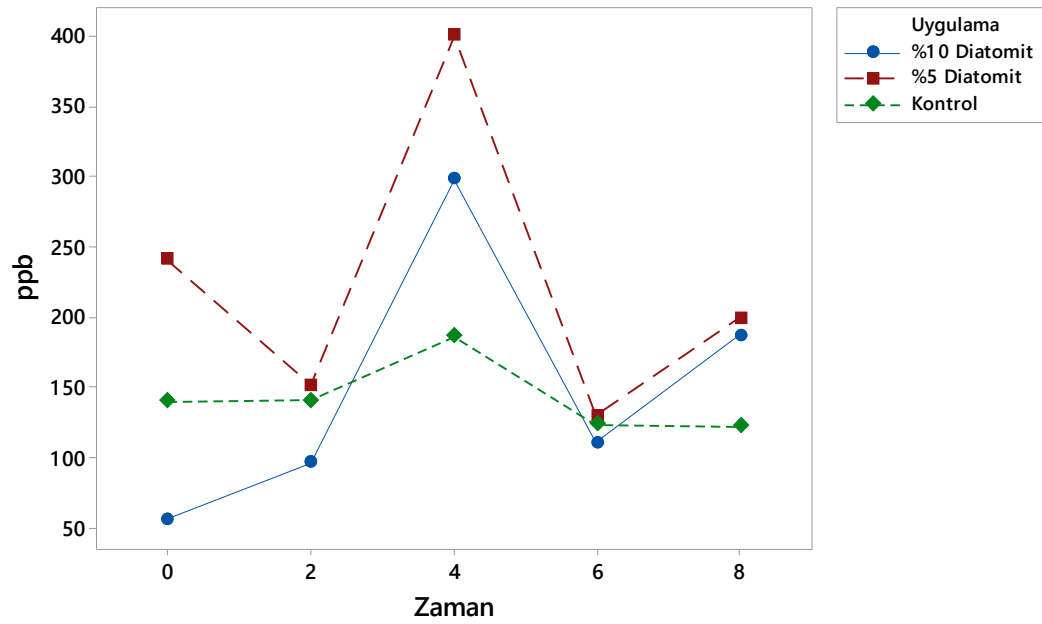
	Başlangıç	2. Hafta	4. Hafta	6. Hafta	8. Hafta	Ortalama	p
Zn	Kontrol	1141,77	288,93	551,12	315,25	1289,62	717,37± 858,73
	%5 Diatomit	736,07	2117,48	1154,88	305,37	2920,67	1446,89 ± 1663,44
	%10 Diatomit	2485,54	2613,37	298	330,76	2178,41	1581,22 ± 1871,48
	Ortalama	1454,46	1673,26	668,00	317,13	2129,57	
Se	Kontrol	139,2	139,98	185,62	123,21	112,11	140.02 ± 91.01
	%5 Diatomit	240,62	151,01	399,91	129,07	198,82	223.89 ± 156.14
	%10 Diatomit	55,59	96,18	297,56	110,41	186,52	149.25 ± 118.49
	Ortalama	145,14	129,06	294,36	120,90	165,82	

Grupların Zn değerlerinin haftalar içindeki etkileşimleri Şekil 1 ve Se etkileşimleri de Şekil 2 de görülmektedir. Başlangıç, 2., 4., 6. ve 8. hafta iz element değerlerinin zamana göre değişimi incelendiğinde; kontrol grubu, %5 ve %10 diatomit katkılı yemle beslenen gruplar için; Serum Zn ve Se değerlerinde başlangıçtan 8. haftanın sonuna kadar

istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu Zn değeri başlangıç değerine göre 2. hafta düşüş göstermiş, 4. hafta az bir oranda artmışsa da 6. hafta tekrar düşüş görülmüştür. Sekizinci hafta ortalaması diğer tüm değerlere göre yüksek çıkmıştır. %5 diatomit uygulanan grubun Zn değerleri incelendiğinde ise,



Şekil 1: %5 ve %10 diatomit katkısı yapılan hayvan gruplarının Zn etkileşimleri (n=5, ppb).



Şekil 2: %5 ve %10 diatomit katkısı yapılan hayvan gruplarının Se etkileşimleri (n=5, ppb).

2. hafta ölçülen değer başlangıç değerine göre yüksek olduğu tespit edilmiş, Zn değeri 6. haftaya kadar düşük göstermiştir. 8. hafta en yüksek değer tespit edilmiştir. %10 diatomit uygulanan grubun değerleri incelendiğinde, 2. hafta ortalaması başlangıç değerine göre hafif artış gösterse de 6. haftaya kadar düşük görülmüş olup 8. hafta önemli ölçüde yükselmiştir. Her grupta da 8. hafta Zn değerleri önemli oranda yükseliş göstermiştir (Şekil 1).

Serum selenyum değerlerinin 8 haftalık etkileşim ortalamalarına bakıldığında, kontrol grubunda 4. haftaya kadar düşük bir yükseliş tespit edilse de 8. haftanın sonunda Se değeri düşmüştür. Başlangıç değerine göre %5 diatomit uygulanan grupta 2. hafta ortalama değer düşüş göstermiş 4. hafta yükselen ortalama değer 6. hafta önemli oranda düşmüş ve 8. hafta sonunda tekrar yükseliş göstermiştir. %10 diatomit uygulanan grupta ise 2. hafta ölçülen değer başlangıç değerine göre düşük

olarak belirlenmiş fakat 4. hafta en yüksek değere ulaşmış olup 6. hafta değeri en düşük seviyede tespit edilmiş 8. hafta tekrar yüksek olarak belirlenmiştir. Her grupta da dördüncü hafta ölçülen değer en yüksek değer olarak belirlenmiştir (Şekil 2).

Canlı ağırlık bulguları değerlendirildiğinde kontrol grubu kontrol grubu canlı ağırlık ortalaması başlangıçta düşük ( $36\pm9,92$ ) iken 8. hafta yapılan tartımda en yüksek ( $38\pm9,08$ ) olduğu görülmüştür. Kontrol grubunda canlı ağırlık artışının zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir ( $p<0.05$ ). Buna göre can ağırlık ortalaması başlangıç

ölçümünde en düşük iken 8. hafta ölçümünde en yüksek değere sahip olduğu görülmüştür. Sekiz hafta %5 ve %10 diatomit katkılı yem ile beslenen gruplarda da canlı ağırlıkların zamana bağlı olarak istatistiksel farklılık gösterdiği belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Elde edilen sonuçlara göre başlangıçta %5 diatomit verilen grubun ağırlık ortalaması ( $34.20\pm8.23$ ) ve %10 diatomit verilen grubun ortalaması ( $48.80\pm22.6$ ) iken 8. hafta sonunda en yüksek değerlerde ( $40.40\pm9.07$ ) ve ( $54.40\pm20.18$ ) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2).

**Tablo 2:** Canlı ağırlıkların zamana göre değişimi.

Zaman	Birim	n	Kontrol Grubu	%5 Diatomit	%10 Diatomit
				Katkılı Yem	Katkılı Yem
Başlangıç	kg	5	$36.00\pm9,92^B$	$34.20\pm8.23^B$	$48.80\pm22.60^C$
4.Hafta	kg	5	$37.00\pm9,35^{AB}$	$36.80\pm8.41^B$	$51.20\pm21.10^B$
8.Hafta	kg	5	$38.00\pm9,08^A$	$40.40\pm9.07^A$	$54.40\pm20.18^A$

## Tartışma ve Sonuç

Canlıların yaşaması için çok önemli olan iz elementlerin eksikliğinde çeşitli rahatsızlıklar ortaya çıkmaktadır (Batmaz 2014). Yem katkı maddesi olarak yaygın şekilde kullanılan diatomitin organik hayvancılıkta iz element kaynağı olabileceği düşünülmektedir (Bernard ve ark., 2009). Galyean ve arkadaşları (1999) normal bağışıklık fonksiyonu ve hastalık direnci için önemli olduğu belirlenen Zn, Cu, Se ve Cr gibi iz elementlerin yeni doğan buzağılara takviye olarak verilmesinin bağışıklık fonksiyonunu etkilediğini belirtmişlerdir. Smith ve arkadaşları, süt sığırlarında ilk laktasyonda Se takviyesi ile mastitisin klinik semptomlarının görülme sıklığının ve şiddetinin azalttığını bildirmiştir. Emeruwa ve ark. (2018) ve Adebisi ve ark. (2009) diatomitin hayvanlar için önemli olan Se ve Zn gibi iz elementlerin kaynağı olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışmada ise Serum Zn ve Se düzeyleri açısından bakıldığında günlük rasyona %5 ve %10 diatomit katkısı Zn ve Se düzeylerinde anlamlı farklılıklara neden olurken özellikle, %10 diatomit katkısının Zn düzeylerinde ve %5 diatomit katkısının da Se düzeyinde önemli artışa neden olduğu görülmüştür (Tablo 1). 15 günlük etkileşimler incelendiğinde da Zn değerlerinin %5 diatomit katkılı yemle beslenen grubun Zn değerlerinin 8. haftanın sonunda en yüksek artış gösterdiği, % 10 diatomit katkılı yemle beslenen grubun da 8. hafta değerinin önemli oranda arttığı

belirlenmiştir (Şekil 1). Se değerlerinin de %5 ve %10 diatomit katkılı yemle beslenen gruplarda 4. hafta en yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). Elde edilen bu veriler Emeruwa ve ark. ile Adebisi ve ark. belirttikleri gibi diatomitin hayvanlar için Se ve Zn kaynağı olabileceğini desteklemektedir; bununla beraber yem katkı maddesi olarak diatomitin etkisini incelediğimiz bu iz elementler için daha önce yapılmış çalışmalara rastlanılmamıştır.

Bennett ve ark. (2011) ve Ahmed, Laing ve ark. (2013) tarafından da diatomitin deney hayvanlarının vücut ağırlığını, yemden yararlanma ve büyüme oranını önemli ölçüde artırdığını ve parazit yükünü azalttığı ifade edilmiştir. Bıldırcın yavrularının kullanıldığı bir çalışmada, aflatoksin içeren bir diyetle diatomit eklenmesinin, aflatoksinin canlı ağırlığı artışı üzerindeki olumsuz etkisini önemli ölçüde azalttığını gözlemlenmiştir. Etlik piliçlerin, sırasıyla 400 ve 800 mg/kg'da diatomit, önemli ölçüde daha fazla vücut ağırlığına ve daha az yem dönüştürme oranına ve serum toplam protein ve albümin değerlerinde bir artışa neden olduğunu bildirmiştir (Parlat ve ark., 1999). Lakkawar ve arkadaşları, diatomitin etlik piliçlerin yemlerine 400 ve 800 mg/kg eklendiğinde büyüme parametreleri ve serum biyokimyasal değerleri üzerindeki zararlı etkilerini önemli ölçüde azalttığı kaydedilmiştir (Lakkawar ve ark., 2016). Ewuola ve arkadaşları ortalama ağırlık artışı, yemden yararlanma ve yem katkı maddesi olarak % 6 diatomit katkısı ile



beslenen yavru horozların kemik gelişiminde önemli bir iyileşme olduğunu bildirmişlerdir (Ewuola ve ark., 2014). Martel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 252 domuz yavrusunun yemine diatomitin asıl bileşeni olan SiO<sub>2</sub> eklenerek yem alımını %4,13 oranında ve ortalama günlük kazancını %3,26 oranında artırdığı kaydedilmiştir (Martel-Kennes ve ark., 2016). Isabirye ve arkadaşlarının 2021 yılında 200 tavuk üzerinde 24 hafta süresince yapmış oldukları çalışma sonunda %4 diatomit uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre canlı ağırlık artışında anlamlı fark tespit edilmemiştir (Isabirye ve ark., 2021).

Bu çalışmada günlük rasyona %5 ve %10 diatomit katkısı yapıldığında elde edilen sonuçlar Isabirye ve arkadaşlarının aksine Bennet, McLean, Lakkawar, Ewuola, Martel ve bunların arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda elde ettikleri sonuçları destekler nitelikte olduğu görülmüştür. Günlük rasyona %10 diatomit katkısı ile hayvanların canlı ağırlık artışlarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre canlı ağırlık artışının %5 ve %10 diatomit katkısı verilen gruplarda daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak Zn ve Se'un kanda düşük seviyede bulunması hayvanlarda verim ve üreme yönünden ölümlere ve önemli ölçüde ekonomik kayıplara neden olabileceği düşünülürse, bu çalışmada rasyona diatomit ilavesinin kan Zn ve Se seviyelerini arttırmasının hayvanların genel sağlığı üzerine olumlu etkiler meydana getireceği öngörülmektedir. Böylelikle hayvanların iz element eksikliğinde özellikle de beyaz kas hastalığını önleyici amaçla diatomit kullanımı önerilebilir. Ayrıca diatomit kullanımının hayvanların canlı ağırlık artışında etkili olabileceği, bununla birlikte diatomitin hayvanlara bilinçli şekilde verilmesi gerektiği, böylece verimin artırılıp, kayıpların önlenmesi mümkün olabilir. Bununla birlikte konu ile ilgili daha kapsamlı çalışmaların yapılmasının gerekliliğinin yanı sıra yapılan bu çalışmanın gelecekte yapılacak araştırmalar için önemli bir zemin oluşturabileceği düşünüldü.

## Kaynaklar

Adebiyi O, Sokunbi O, Ewuola E, 2009: Performance evaluation and bone characteristics of growing cockerel fed diets containing different levels of diatomaceous earth. *Middle East J. Sci, Res* 4, 36-39.

Ahmed M, Laing M, Nsahlai I, 2013: Studies on the ability of two isolates of *Bacillus thuringiensis*, an isolate of *Clonostachys rosea* f. *rosea* and a diatomaceous earth product to control gastrointestinal nematodes of sheep. *Biocontrol Science and Technology*, 23(9), 1067-1082.

Avcı M, Karakılıç Z, Kanat R, 2000: Vitamin A, E ve selenyumun koyunlarda döl verimi ve bazı biyokimyasal parametre düzeyleri ile kuzularında yaşama gücü ve canlı ağırlık üzerine etkisi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 24(1), 45-50.

Batmaz M, 2014: Siverek Bölgesinde Koyunlarda Selenyum, Bakır Ve Çinko Seviyelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.

Beltran M, Martin R, 2016: Diatomaceous earth inhibited the in vitro migration of oesophagostomum dendatum larvae. *Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41(2).

Bennett D, Yee A, Rhee Y, Cheng Y, 2011: Effect of diatomaceous earth on parasite load, egg production, and egg quality of free-range organic laying hens. *Poultry Science*, 90(7), 1416-1426.

Bernard G, Worku M, Ahmedna M, 2009: The effects of diatomaceous earth on parasite-infected goats. *Bull. Georgian Natl. Acad. Sci* 3, 129-135.

Dalı İ, 2018: Kahramanmaraş merkez ilçelerindeki koyunlarda demir, bakır ve çinko seviyelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, HRÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.

Durmuş İ, Eryavuz A, 2012: Ruminant hayvanlarda yüksek çinko tüketiminin etkileri. *Kocatepe Veteriner Dergisi* 5(2), 35-41.

Emeruwa C, Anurudu N, 2018: Performance of pregnant West African Dwarf ewes fed diets supplemented with varying levels of fossil shell flour. 10th International Livestock Environment Symposium (ILES X), American Society of Agricultural and Biological Engineers, St. Joseph, Michigan, pp. 1-6.

Ewuola E, Adebiyi O, Sokunbi O, 2014: Haematological and some serum biochemical response of growing cockerels to dietary diatomaceous earth. *J. Anim. Sci. Adv*, 4(1), 699-704.

Galyean M, Perino L, Duff G, 1999: Interaction of cattle health/immunity and nutrition. *Journal of Animal Science* 77(5), 1120-1134.

Isabirye RA, Biryomumaisho S, Okwee-Acai J, Okello S, Nasinyama GW, 2021: Effect of diatomaceous earth on growth rate, egg production, feed conversion efficiency and parasitic load in hens raised on deep litter. *European journal of agriculture and food Sciences*, 3(1):97-103.

Köster H, 2013: <https://agrisilica.co.za/en/8-diatomite-in-animal-feeds>, Erişim tarihi 15.04.2013.

Lakkawar A, Sathyanarayana M, Narayanaswamy H, Yathiraj S, Shridhar N, Krishnaveni N, 2016: Efficacy of diatomaceous earth in amelioration of aflatoxin induced toxicity in broiler chicken. *Indian Journal of Animal Research* 50(4), 529-536.

Martel-Kennes Y, Lévesque J, Decaux C, 2016: Effect of crystalline silicon dioxide in piglet feed on growth performance with different levels of growth promoters. *Journal of Animal Science* 94, 488-488.

Nkwana A, Hoon J, Fourie P, 2019: The effect of different inclusion levels of diatomaceous earth in feedlot diets on the performance of lambs. *Grootfontein Agric*, 19(1), 66-72.

- Paksoy N, İriadam M, 2012: Kilis keçilerinde serum selenyum düzeylerinin araştırılması. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1(1), 6-8.
- Parlat S, Yıldız A, Oguz H, 1999: Effect of clinoptilolite on performance of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) during experimental aflatoxicosis. *British poultry science* 40(4), 495-500.
- Patra A, 2007: Nutritional management in organic livestock farming for improved ruminant health and production. *An overview. Livest. Res. Rural Dev* 19(3), 41.
- Smith K, Conrad H, Amiet B, Schoenberger P and Todhunter D, 1985: Effect of vitamin E and selenium dietary supplementation on mastitis in first lactation dairy cows. *J. Dairy Sci* 68(Suppl 1), 190.
- Sugen B, Güneş V, 2008: Beyaz kas hastalıklı kuzularda kalp kası hasarının teşhisinde kardiyak troponin kit analizleri ve serum enzim aktivitelerinin önemi. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 17(3), 144-149.
- Taş B, M. Çetin, 2012: Biyolojik orijinli tek doğal mineral diyatomit. *Tübav Bilim Dergisi* 5(2), 28-46.
- Tórtora-Pérez, J, 2010: The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Ruminant Research* 89(2-3), 185-192.
- Vázquez-Armijo J, Rojo J, López D, Tinoco J, González A, Pescador N, Domínguez-Vara I, 2011: Trace elements in sheep and goats reproduction: A review. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14(1), 1-13.
- Yadav A, Kumar J, Anand M, Swain D, Yadav D, 2016: Effect of zinc and selenium supplementation on blood biochemical profile in pure bred Barbari goat. *Veterinary Practitioner* 17(1): 110-111.
- Zarczynska K, Sobiech P, Radwinska J, Rekawek W, 2013: Effects of selenium on animal health. *Journal of Elementology*, 18(2).

\*Yazışma Adresi: Mehmet Şevki ÇADIRCI

TOBB Fen Lisesi Müdürlüğü, Haliliye, Şanlıurfa, Türkiye.

e-mail: msevki@harran.edu.tr

## Tildipirosinin Sığır Trakea Epitel Hücresi Üzerinde Yara İyileştirici Etkisi

Yaşar ŞAHİN<sup>1,a,\*</sup>, Ebru YILDIRIM<sup>1,b</sup>, Hüsamettin EKİCİ<sup>1,c</sup>, Mustafa TÜRK<sup>2,d</sup>,  
Esra ARAT<sup>3,e</sup>

<sup>1</sup>Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Yahşihan, Kırıkkale, Türkiye

<sup>2</sup>Kırıkkale Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yahşihan, Kırıkkale, Türkiye

<sup>3</sup>Kırıkkale Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü (KÜBTUAM),  
Yahşihan, Kırıkkale, Türkiye

<sup>a</sup>ORCID numarası: 0000-0001-5936-4210, <sup>b</sup>ORCID numarası: 0000-0002-6289-0729, <sup>c</sup>ORCID numarası: 0000-0001-6403-737X, <sup>d</sup>ORCID numarası: 0000-0001-8202-090X, <sup>e</sup>ORCID numarası: 0000-0002-9259-2538

Geliş Tarihi: 07.07.2021

Kabul Tarihi: 11.10.2021

**Özet:** Bu çalışmada; sığır solunum yolu hastalıkları tedavisinde kullanılan tildipirosinin, sığır trakea epitel hücresi üzerinde *in vitro* yara iyileşmesi etkisinin araştırılması amaçlandı. *In vitro* yara yöntemi ile her kuyucuğa ekilmiş olan sığır trakea epitel hücreleri üzerinde, 200 µL'lik pipet ucu (dikey) aracılığıyla bir yara alanı oluşturuldu. *In vitro* yara oluşturulmuş sığır trakea epitel hücreleri üzerine tildipirosinin konsantrasyonları (5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL) ve kontrol grubu uygulandı. *In vitro* yara görüntüleri; 0'inci saat, 24'üncü saat ve 48'inci saatte izlendi. Çalışmanın 24'üncü saatinde yara alanı kapanma yüzdesi, kontrol grubuna kıyasla; tildipirosinin 50 µg/mL konsantrasyonda istatistiki olarak önemli fark bulunamazken 5, 10 ve 25 µg/mL konsantrasyonlarında istatistiki olarak fark anlamlı bulundu. Çalışmanın 48'inci saatinde, kontrol grubuna kıyasla 25 ve 50 µg/mL tildipirosin konsantrasyonları arasında istatistiki olarak önemli fark bulunamazken, 5 µg/mL (%96,61±1,69) ve 10 µg/mL (%96,42±1,78) tildipirosin konsantrasyonları arasında yara alanı kapanma yüzdeleri arasında istatistiki olarak fark anlamlı bulundu. Sonuç olarak tildipirosinin düşük konsantrasyonlarındaki yara iyileşme yüzdelerinin (48'inci saat) yaklaşık olarak %96 olması, hastalıkların tedavisine ek olarak çeşitli mikroorganizma ve maddeler tarafından epitel hücrelerinde meydana gelen hasarlara karşı doku bütünlüğünü koruma ve tedaviye katkı sağlayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *In vitro*, Sığır, Tildipirosin, Trakea epitel hücresi, Yara iyileşmesi

### Wound Healing Effect of Tildipirosin on Bovine Tracheal Epithelial Cell

**Abstract:** This study aimed to investigate the *in vitro* wound healing effect of tildipirosin, used in treating bovine respiratory diseases, on bovine tracheal epithelial cells. With an *in vitro* wound method, a wounded area was created on bovine tracheal epithelial cells found in each well with a 200 µL pipette tip (vertical). Concentrations of tildipirosin (5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL) and control group were applied on *in vitro* wound formed bovine tracheal epithelial cells. *In vitro* wound images were monitored at 0th, 24th and 48th hours. No statistically significant difference was found at 50 µg/mL concentration of tildipirosin at the 24th hour of the study regarding to wound healing area. In contrast, the difference was statistically significant at 5, 10, and 25 µg/mL concentrations of tildipirosin as compared to control group. At the 48th hour of the study, there was no statistically significant difference between 25 and 50 µg/mL concentrations of tildipirosin compared to the control group. In contrast, 5 µg/mL (%96,61±1,69) and 10 µg/mL (%96,42±1,78) tildipirosin statistically increased the wound healing percentage. To conclude, the wound healing rate (48th hour) at low concentrations of tildipirosin was approximately %96, and this may contribute to the protection and treatment of tissue integrity against epithelial cell damage by various microorganisms and substances in addition to the treatment of diseases.

**Keywords:** Bovine, *In vitro*, Tildipirosin, Tracheal epithelial cell, Wound healing.

### Giriş

Tildipirosin; sığır solunum yolu hastalığına neden olan *Mannheimia haemolytica* ve *Pasteurella multocida* gibi bakteriyel patojenlerin tedavisi için geliştirilmiş makrolid grubu bir antibiyotiktir (Anderson ve ark., 2012; Peres ve ark., 2020). Son yıllarda sığır ve domuz solunum yolu hastalığı tedavisi için ruhsatlandırılmış olan tildipirosin, 16 üyeli halkalılar sınıfında yer almakta olup (Lei ve ark., 2018; Zeng ve ark., 2018), doğal olarak oluşan tilosinden türetilen yarı sentetik bir makroliddir (Giguère, 2013). Diğer makrolid grubu antibiyotikler

gibi tildipirosin, bakteri ribozomunun 50S alt birimine bağlanıp protein sentezini engeller ve bakteriyostatik etki yapmaktadır (Papich, 2018; Pyörälä ve ark., 2014; Zhanel ve ark., 2001).

Genel olarak makrolid antibiyotikler; dokulara geniş dağılım göstermesinden ve periferel dokulardaki yoğunluğu serumdaki yoğunluğundan yüksek olmasından dolayı akciğerdeki yoğunlukları uzun sürelidir (Benchaoui ve ark., 2004; Nowakowski ve ark., 2004). Tildipirosin, solunum sistemine hızlı ve geniş bir şekilde dağılır ve yavaş

bir şekilde elimine edilmektedir (Menge ve ark., 2012; Zeng ve ark., 2018). Tildipirosinin yapısındaki bazik azot grupları, pKa değerleri altındaki asidik ortamlarda pozitif yüklenmesine neden olabilmektedir. Bu özelliğiyle; hücre içi ilgisi artarak, hücre içi geniş dağılım göstermesine neden olmaktadır (Papich, 2018). Dağılım hacminin yüksek olması ve hücre içinde önemli oranda bulunmasından dolayı hücre içi bakteriler üzerinde geniş etki göstermesi beklenmektedir (Galecio ve ark., 2020). Makrolid antibiyotiklerin; nötrofil, makrofaj ve solunum yolu epitel hücreleri gibi çok sayıda ökaryot hücrede birikebilmekle birlikte (Čulić ve ark., 2001), hücre içi yoğunluğu hücre dışı yoğunluğundan yaklaşık 300 kat fazla olabilmektedir (Van Bambeke ve ark., 2006). Ancak hücre içi bakteriler tarafından meydana gelen hastalıkların tedavisinde sadece ilacın hücre yoğunluğunun yüksek olması yeterli olmayabilir. Ayrıca ilacın hücre içinde yeterli süre ve konsantrasyonda bulunması da gerekmektedir (Şahin ve Yıldırım, 2020).

Makrolid antibiyotiklerin antimikrobiyel etkisinin yanında antiinflamatuvar ve immünomodülatör etkilerinin olduğu bilinmektedir (Fischer ve ark., 2011; Guillot ve ark., 2011; Ianaro ve ark., 2000). Bu antibiyotiklerin antiinflamatuvar etkisi, proinflamatuvar araçlar ve sitokinlerin üretimini önleme yeteneğine bağlıdır. Bu özelliklerinden dolayı antibakteriyel etkilerinden bağımsız olarak terapötik etkiler gösterebileceği öne sürülmüştür (Ianaro ve ark., 2000). Yapılan literatür taramasında tildipirosinin sığır trakea epitel hücresi üzerinde *in vitro* yara iyileşmesi etkisini araştıran bir çalışma bulunmamıştır. Bu nedenle yapılan çalışmada, tildipirosinin sığır trakea epitel hücresi üzerinde *in vitro* yara iyileşmesi etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı gerekmediği yazısı alındı (Evrak tarih ve sayısı: 21/02/2020-E.1538).

Tildipirosinin (BLDPharn, BD448267, Çin) konsantrasyonları, %0,1 dimetil sülfoksit (DMSO, İsolab, Almanya) ve %99,9 besiyerinde çözülürerek hazırlandı.

**Hücre Kültürü İzolasyonu:** Sığır trakea epitel doku örnekleri, mezbanede kesilen sağlıklı Simental ırkı erkek sığırlardan alındı. Bu trakea epitel doku örnekleri, önce %0,9 izotonik ile seyreltilmiş %1-2 batikon solüsyonuna ve sonra %0,9 izotonik içine batırılıp çıkarıldı. Trakea epitel doku örnekleri, antibiyotikli PBS ile yıkandıktan sonra bağ dokusu parçalarından arındırılarak petri kutularına yerleştirildi. Dokudan; hücrelerini izole etmek için, önce örnekler mekanik olarak kazındı ve

sonra küçük parçalara bölündü. Elde edilen bu doku örnekleri; besiyeri (%79 DMEM-F2, %20 fetal sığır serumu, %1 penisilin-streptomisin) bulunan 25 cm<sup>2</sup>lik kültür flasklarına koyularak inkübe (%5 CO<sub>2</sub>/hava, 37°C) edildi. Sığır trakea epitel hücrelerinin çoğalmasına bağlı olarak besiyeri (%89 DMEM-F2, %10 fetal sığır serumu, %1 penisilin-streptomisin) yaklaşık iki günde bir değiştirildi (Beckmann ve ark., 1991; Kürüm ve ark., 2019).

**In Vitro Yara Modeli:** Sığır trakea epitel hücreleri; hemositometri cihazı ile sayımı yapıldıktan sonra, her kuyucukta 3x10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu plate'e ekildi. Hücreler, etüvde (%5 CO<sub>2</sub>/hava, 37°C) 24 saat inkübe edildi. Bu inkübasyon sonunda, trakea epitel hücrelerinin bulunduğu 24 kuyucuklu plateden hücre vasatları çıkartıldı. Her kuyucuk tabanında, 200 µL'lik pipet ucu (dikey) aracılığıyla bir yara alanı oluşturuldu. Bu çizme işlemi sonucu plateden ayrılan hücreler, PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Önceden hazırlanmış olan etken madde konsantrasyonları (5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL) ve kontrol grubu (%0,1 DMSO-%99,9 besiyeri) üç tekrarlı olacak şekilde trakea epitel hücreleri üzerine uygulandı. *In vitro* yara görüntüleri; 0'inci saat, 24'üncü saat ve 48'inci saatte Leica DM6000 inverted mikroskop aracılığıyla izlendi ve görüntüler alındı (Wang ve ark., 2019).

**İstatistiksel Değerlendirme:** *In vitro* yara görüntüleri; model oluşturulduktan 0, 24 ve 48 saat sonra aynı alanlardaki yara bölgeleri alanı ImageJ (1.53e, National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak hesaplandı. Yara iyileşmesi oranı (%) aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\left[ \frac{(\text{yara alanı } t_0 - \text{yara alanı } t) / \text{yara alanı } t_0}{100} \right]$$

Çalışmada elde edilen veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verildi. İstatistik analizler, SPSS programı (PASW Statistics for Windows, version 18.0. Chicago, USA) kullanılarak yapıldı. Grupların parametrik dağılım gösterip göstermediği normalite testi ile belirlendi. Gruplar parametrik dağılım gösterdiği için OneWay ANOVA, gruplar (her grup kendi saat aralığına göre karşılaştırma yapıldı) arası farkın önemlilik kontrolü için Tukey testi (post hoc) uygulandı. Yapılan testlerde P < 0,05 değeri önemli olarak kabul edildi.

## Bulgular

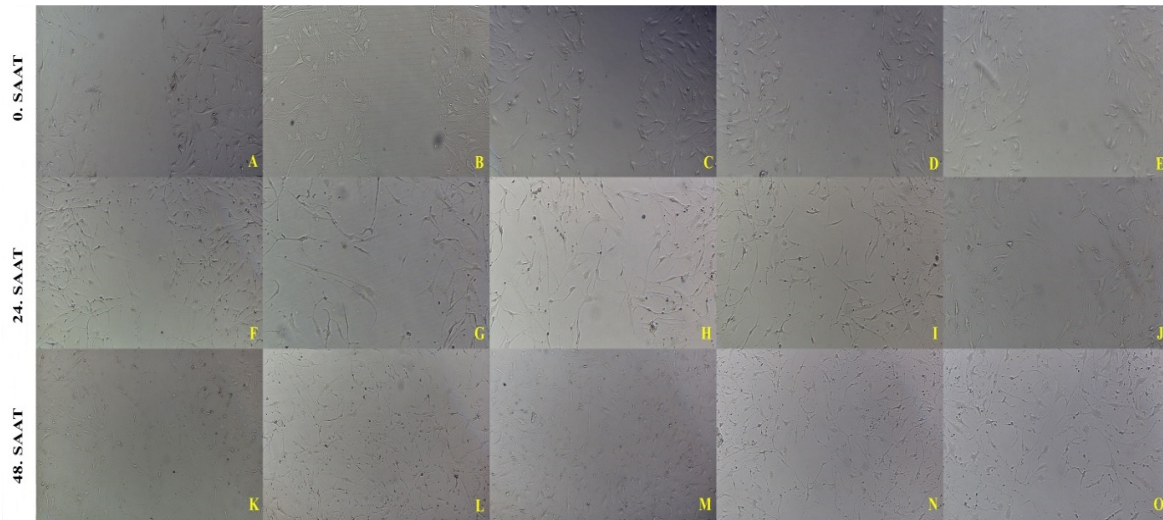
Tildipirosinin uygulandığı trakea epitel hücrelerine ait zamana bağlı yara iyileşme yüzdesi Tablo 1'de verildi. Buna göre 24'üncü ve 48'inci saatlerde, tildipirosinin yüksek konsantrasyonundan düşük konsantrasyonuna doğru *in vitro* sığır trakea epitel hücreleri üzerinde yapılan yaranın iyileşme yüzdesinin arttığı gözlemlendi.

Tildipirosinin 50 µg/mL'lik konsantrasyonu ile kontrol grubunun, 24'üncü saatte yara alanı kapanma yüzdeleri arasında istatistiki olarak önemli fark bulunamadı ( $P > 0,05$ ). Buna karşın 24'üncü saatte, tildipirosinin 5, 10 ve 25 µg/mL'lik konsantrasyonları ile kontrol grubu arasında önemli derecede fark bulundu ( $P < 0,001$ ). Kontrol grubuna kıyasla 25 ve 50 µg/mL'lik tildipirosin konsantrasyonları arasında 48'inci saatte istatistiki olarak önemli fark bulunamadı ( $P > 0,05$ ). Tildipirosinin 5 ve 10 µg/mL'lik konsantrasyonları ile kontrol grubunun, 48'inci saatte yara alanı kapanma yüzdeleri arasında fark anlamlı bulundu ( $P < 0,01$ ) (Tablo 1). Tildipirosin konsantrasyonları ve kontrol grubunun, siğir trakea epitel hücresi *in vitro* yara ve zamana bağlı iyileşmesi görüntüleri Şekil 1'de verildi.

**Tablo 1.** *In vitro* siğir trakea epitel hücrelerinin zamana bağlı yara iyileşme yüzdesi (%).

Konsantrasyon	24. saat	48. saat
Kontrol	56,76±2,08 <sup>a</sup>	83,33±0,33 <sup>a</sup>
50 µg/mL	59,26±1,82 <sup>a</sup>	82,15±0,62 <sup>a</sup>
25 µg/mL	69,02±2,45 <sup>b</sup>	86,39±2,91 <sup>a</sup>
10 µg/mL	72,41±0,76 <sup>b</sup>	96,42±1,78 <sup>b</sup>
5 µg/mL	74,07±0,12 <sup>b</sup>	96,61±1,69 <sup>b</sup>
P değeri	$p < 0,001$	$p < 0,01$

\*Aynı sütundaki farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark anlamlıdır.



**Şekil 1.** Siğir trakea epitel hücresi *in vitro* yara ve yara iyileşmesi görüntüleri, 50 µg/mL (A, F, K), 25 µg/mL (B, G, L), 10 µg/mL (C, H, M) ve 5 µg/mL (D, I, N) tildipirosin konsantrasyonları ve kontrol grubu (E, J, O).

## Tartışma ve Sonuç

Solunum yolu epiteli, solunum yolunun dış ortama karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Solunum yolu epitelinde meydana gelen yaralanmalardan hemen sonra, bu tabakanın bütünlüğü ve işlevlerini geri kazanması için hızla onarılması ve yenilenmesi gerekmektedir (İosifidis ve ark., 2016). Genel olarak bu tabaka; patojeni, hücre içinde bir dizi işlemde sonrası fagolizozom aracılı öldürmeyle konak savunmasında önemli bir rol oynadığını bilinmektedir. Bazı durumlarda ise hücre içi patojenler; fagolizozom aracılı öldürmeden kaçarak, hücre içinde yerleşip ve replikasyon yapmaktadırlar. Bunun sonucu solunum yolu epiteli hasarı ve inflamatuvar tepkileri tetiklemeye neden olarak, enfeksiyonun yayılmasına yol açmaktadır (Bertuzzi ve ark., 2019).

Gouzos ve ark. (2020); eritromisin, roksitromisin, azitromisin ve klaritromisin gibi antibiyotiklerin, primer insan nazal epitel hücreleri ve primer fibroblastların *in vitro* ortamda oluşturulan yara iyileşmesi ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Klaritromisin; azitromisin, eritromisin ve roksitromisine göre fibroblast hücrelerinin *in vitro* yara iyileşme oranının daha az olduğunu bulmuşlardır. Buna karşın azitromisin primer fibroblast ve nazal epitel hücreleri üzerinde oluşturulan yara bölgesinin 36'ıncı saat sonunda kapandığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada antibiyotiklerin, fibroblast ve nazal epitel hücre göçü üzerindeki etkilerinin farklılığından dolayı, postoperatif epitel iyileşmelerinin de farklı olduğu ifade edilmiştir. Sunulan çalışmada hücre hatları ve etken madde farklı olmakla birlikte tildipirosinin; Gouzos ve ark. (2020)'nın çalışmasındaki azitromisin

gibi epitel hücre (*in vitro*) yara iyileşmesinde önemli etkileri bulunmaktadır. Ayrıca Gouzos ve ark. (2020) azitromisin hariç makrolid antibiyotiklerin fibroblast ve nazal epitel hücre tiplerinde ROS aktivasyonlarını azaltma eğiliminde olduğunu bildirmişlerdir. Bu ROS aktivasyonunun azalması ile hücre göçü arasında negatif ilişkinin bulunduğunu bildirilmiştir. Yapılan çalışmada tildipirosinin yüksek orandaki hücre göçü, hücre hattı farklı olmakla birlikte Gouzos ve ark. (2020)'nın çalışmasındaki makrolid antibiyotikler (azitromisin hariç) gibi ROS aktivasyonunun baskılanmasına bağlı olabileceği düşünülebilir.

Epitel dokuda yara iyileşmesi, epitel hücrelerinin koordineli göçünü ve çoğalmasını içermektedir. Yaraya bitişik epitel hücreleri, "epitel restitüsyonu" olarak da adlandırılan yara yüzeylerini örtmek için bir tabaka halinde göç etmektedir (Leoni ve ark., 2015). Mencucci ve ark. (2013) azitromisinin (%1,5 solüsyonu) kornea epitel hücreleri üzerinde oluşturulan yarayı (*in vitro*) 48'inci saat sonunda yara alanının %47,3'ünü kapadığını ve hücrelerin yara bölgesine göç ettiğini göstermişlerdir. Yapılan çalışmada, azitromisin gibi yapısında azot grubu ihtiva eden tildipirosin, hücre hattı farklı olmakla birlikte Mencucci ve ark. (2013)'nin çalışması gibi düşük dozlarda 48'inci saat sonunda yara alanının yaklaşık %90'ını kapadığını ve hücrelerin yara bölgesine göç ettiği görülmektedir. İnsanlar için hazırlanmış olan azitromisin oftalmik solüsyon preparatı gibi (Mencucci ve ark., 2013), tildipirosin; solunum yolu enfeksiyonları tedavisi için geliştirilen preparatına ek olarak hayvanlar için oftalmik solüsyonu olarak da kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Sonuç olarak tildipirosinin düşük konsantrasyonlarındaki yara iyileşme yüzdelerinin (48'inci saat) yüzde yüze yakın olması, çeşitli mikroorganizma ve maddeler tarafından epitel hücrelerinde meydana gelen hasarlara karşı koruma ve tedavi etme özelliğine sahip olabilir. Sahip olduğu bu özelliklerle, sadece hastalık tedavisine ek olarak uzun süreli koruyucu etki de sağlayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca ön çalışmalar yapılarak tildipirosinin, hayvanlar için oftalmik solüsyon preparatları da geliştirilebilir.

### Finansal destek

Bu çalışma; Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından, 2020/034 proje numarası ile desteklenmiştir.

### Kaynaklar

Anderson NM, Poehlsgaard J, Warrass R, Douthwaite S, 2012: Inhibition of protein synthesis on the ribosome by tildipirosin compared with other

- veterinary macrolides. *Antimicrob Agents Chemother*, 56 (11), 6033-6036.
- Beckmann JD, Takizawa H, Romberger D, Illig M, Claassen L, Rickard K, Rennard SI, 1991: Serum-free culture of fractionated bovine bronchial epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol*, 28 (1), 39-46.
- Benchaoui HA, Nowakowski M, Sherington J, Rowan TG, Sunderland SJ 2004: Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin in swine. *J Vet Pharmacol Ther*, 27 (4), 203-210.
- Bertuzzi M, Hayes GE, Bignell EM, 2019: Microbial uptake by the respiratory epithelium: outcomes for host and pathogen. *FEMS Microbiol Rev*, 43 (2), 145-61.
- Čulić O, Eraković V, Parnham MJ, 2001: Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *Eur J Pharmacol*, 429 (1-3), 209-229.
- Fischer CD, Beatty JK, Zvaigzne CG, Morck DW, Lucas MJ, Buret AG, 2011: Anti-inflammatory benefits of antibiotic-induced neutrophil apoptosis: tulathromycin induces caspase-3-dependent neutrophil programmed cell death and inhibits NF-kappaB signaling and CXCL8 transcription. *Antimicrob Agents Chemother*, 55 (1), 338-348.
- Galecio JS, Escudero E, Cerón JJ, Crescenzo G, Marín P, 2020: Pharmacokinetics of tildipirosin in ewes after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration. *Animals (Basel)*, 10 (8), 1332.
- Giguère S, 2013: Macrolides, azalides, and ketolides In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Giguère S, Prescott JF, Dowling PM (Eds), 211-231, 5th ed., Wiley Blackwell, Iowa.
- Gouzos M, Ramezanpur M, Bassiouni A, Psaltis AJ, Wormald PJ, Vreugde S, 2020: Antibiotics affect ROS production and fibroblast migration in an *in-vitro* model of sinonasal wound healing. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 110.
- Guillot L, Tabary O, Nathan N, Corvol H, Clement A, 2011: Macrolides: New therapeutic perspectives in lung diseases. *Int J Biochem Cell Biol*, 43 (9), 1241-1246.
- Ianaro A, Ialenti A, Maffia P, Sautebin L, Rombola L, Carnuccio R, Iuvone T, D'Acquisto F, Di Rosa M, 2000: Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. *J Pharmacol Exp Ther*, 292 (1), 156-163.
- Iosifidis T, Garratt LW, Coombe DR, Knight DA, Stick SM, Kicic A, 2016: Airway epithelial repair in health and disease: Orchestrator or simply a player?. *Respirology*, 21 (3), 438-48.
- Kürüm A, Karahan S, Kocamış H, Çınar M, Ergün E, 2019: Determination of antioxidants in bovine oviduct epithelial cell culture isolated at different periods of the estrous cycle. *Turk J Vet Anim Sci*, 43, 448-455.
- Lei Z, Liu Q, Qi Y, Yang B, Khaliq H, Xiong J, Moku GK, Ahmed S, Li K, Zhang H, Zhang W, Cao J, He Q, 2018: Optimal regimens and cutoff evaluation of tildipirosin against *pasteurella multocida*. *Front. Pharmacol*, 9, 765.
- Leoni G, Neumann PA, Sumagin R, Denning TL, Nusrat A, 2015: Wound repair: role of immune-epithelial interactions. *Mucosal Immunol*, 8 (5), 958-968.
- Mencucci R, Pellegrini-Giampietro DE, Paladini L, Favuzza E, Menchini U, Scartabelli T, 2013: Azithromycin: assessment of intrinsic cytotoxic effects on corneal epithelial cell cultures. *Clin Ophthalmol*, 7, 965-971.

- Menge M, Rose M, Bohland C, Zschiesche E, Klip S, Metz W, Allan M, Röpke R, Nürnberger M, 2012: Pharmacokinetics of tildipirosin in bovine plasma, lung tissue, and bronchial fluid (from live, nonanesthetized cattle). *J Vet Pharmacol Ther*, 35 (6), 550-559.
- Nowakowski MA, Inskeep PB, Risk JE, Skogerboe TL, Benchaoui HA, Meinert TR, Sherington J, Sunderland SJ, 2004: Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin, a new triamilide antibiotic, in cattle. *Vet Ther*, 5 (1), 60-74.
- Papich MG, 2018: Chloramphenicol and Derivatives, Macrolides, Lincosamides, and Miscellaneous Antimicrobials In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Riviere JE, Papich MG, (eds), 903-52, 10th ed., John Wiley and Sons, Hoboken.
- Peres PR, Prigol SR, Martín CBG, Feronatod C, Suriñach MC, Kreutz LC, Frandoloso R, 2020: Tildipirosin: An effective antibiotic against *Glaeserella parasuis* from an *in vitro* analysis. *Vet Anim Sci*, 10: 100136.
- Pyörälä S, Baptiste KE, Catry B, Dujkeren EV, Greko C, Moreno MA, Pomba MCMF, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Threlfall EJ, Torren-Edo J, Törneke K, 2014: Macrolides and lincomides in cattle and pigs: use and development of antimicrobial resistance. *Vet J*, 200 (2), 230-239.
- Şahin Y, Yıldırım E, 2020: Antibiyotiklerin hücre içi farmakokinetik özellikleri, *KÜ Tıp Fak Derg*, 22 (3), 470-477.
- Van Bambeke F, Barcia-Macay M, Lemaria S, Tulkens PM, 2006: Cellular pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics: Current views and perspectives. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 9 (2), 218-30.
- Wang X, Decker CC, Zechner L, Krstin S, Wink M, 2019: *In vitro* wound healing of tumor cells: inhibition of cell migration by selected cytotoxic alkaloids. *BMC Pharmacol Toxicol*, 20 (1), 4.
- Zeng D, Sun M, Lin Z, Li M, Gehring R, Zeng Z, 2018: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tildipirosin against *Pasteurella multocida* in a murine lung infection model. *Front Microbiol*, 9, 1038.
- Zhanel GG, Dueck M, Hoban DJ, Vercaigne LM, Embil JM, Gin AS, Karlowsky JA, 2001: Review of macrolides and ketolides: focus on respiratory tract infections. *Drugs*, 61 (4), 443-498.

\*Yazışma Adresi: Yaşar ŞAHİN

Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Yahşihan, Kırıkkale, Türkiye  
e-mail: yasarsahin@kku.edu.tr

## Mastitisli Sığırlardan İzole Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Virülens Gen Profillerinin Belirlenmesi

Ayşe Rümeysa NALÇA<sup>1,a</sup>, Timur GÜLHAN<sup>1,b,\*</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, SAMSUN

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-3947-6511, <sup>b</sup>ORCID:0000-0003-4798-1427

Geliş Tarihi: 03.08.2021

Kabul Tarihi: 12.10.2021

**Özet:** Bu çalışmada anabilim dalı kültür koleksiyonunda bulunan subklinik mastitisli sığır sütlerinden izole edilen 140 adet stafilocok izolatından *Staphylococcus aureus* izolatlarının moleküler identifikasyonu ve bazı önemli virülens genlerinin tespiti amaçlandı. Bu amaçla 140 stafilocok izolatı termonükleaz (*nuc*) gen varlığı yönünden PZR ile incelendi. *nuc* geni (279 bp) tespit edilen 42 izolat *S. aureus* olarak tanımlandı. Ayrıca izolatlarda lökotoksin geni (*pvl*), stafilocokal klasik enterotoksin genleri (*sea*, *seb*, *sec*), ekfoliyatif toksin genleri (*eta*, *etb*), hemolizin genleri (*hla*, *hly*), adezin faktör genleri (*fnbA*, *fnbB*, *clfa*) ve toksik şok sendrom toksin geni (*tst*) olmak üzere 12 farklı virülens geninin varlığı 3 farklı multipleks PZR kullanılarak araştırıldı. İzolatların 30 (%71.4)'u *clfa*, 24 (%57.1)'ü *hla*, 14 (%33.3)'ü *hly*, 10 (%23.8)'u *fnbB*, 6 (%14.2)'sı *fnbA*, 6 (%14.2)'sı *etb*, 5 (%11.9)'i *sec*, 5 (%11.9)'i *tst*, 3 (%7.1)'ü *sea*, 2 (%4.7)'si *pvl* ve 1 (%2.3)'i *eta* geni açısından pozitif bulundu. İzolatların hiçbirinde *seb* geni saptanamadı. İzolatların 38'inde bir ya da daha fazla virülens geni, 29'unda ise iki ya da daha fazla virülens geni belirlendi. 4 izolatta ise incelenen virülens genlerin hiçbirisi saptanamadı. İncelenen izolatlarda en fazla tespit edilen virülens genlerin *clfa* ve *hla* olduğu görüldü. Sonuç olarak sınırlı dahi olsa sığır mastitislerinin patogenezinde rol oynayan virülens gen patternleri ortaya konuldu. Çalışma sonuçlarının sığır mastitislerinin etiyolojisinde önemli rol oynayan *S. aureus*'a ait virülens faktörlerinin karakterizasyon çalışmalarına katkı sağlayacağı kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Mastitis, Sığır, *S. aureus*, Virülens gen profili.

### Determination of Virulence Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolated from Cattle with Mastitis

**Abstract:** This study aimed to determine the molecular identification of *Staphylococcus aureus* isolates and some important virulence genes from 140 staphylococci samples isolated from cow milk with mastitis in the culture collection of the department. For this purpose, the presence of the thermonuclease (*nuc*) gene in 140 *S. aureus* isolates was examined by PCR. Forty-two isolates that were positive for the *nuc* gene (279 bp) were identified as *S. aureus*. In addition, the isolates were examined for the presence of 12 different virulence genes, including leukotoxin gene (*pvl*), staphylococcal classical enterotoxin genes (*sea*, *seb*, *sec*), exfoliative toxin genes (*eta*, *etb*), hemolysin genes (*hla*, *hly*), adhesin factor genes (*fnbA*, *fnbB*, *clfa*), and toxic shock syndrome toxin gene (*tst*), using three different multiplex PCR. Of the isolates were found to be positive 30 (71.4%) for *clfa*, 24 (57.1%) *hla*, 14 (33.3%) *hly*, 10 (23.8%) *fnbB*, 6 (14.2%) *fnbA*, 6 (14.2%) *etb*, 5 (11.9%) *sec*, 5 (11.9%) *tst*, 3 (7.1%) *sea*, 2 (4.7%) *pvl*, and 1 (2.3%) *eta* genes. The *seb* gene was not detected in any of the isolates. At the same time one or more virulence genes were determined in 38 of 42 isolates, two or more virulence genes in 29 of the isolates. None of the virulence genes examined in 4 isolates could be detected. It was seen that the most detected virulence genes in the analyzed isolates were *clfa* and *hla*. As a result, virulence gene patterns that play a role in the pathogenesis of bovine mastitis, even if limited, were revealed. It was concluded that the results would contribute to the characterization studies of virulence factors belonging to *S. aureus*, which play an important role in the etiology of bovine mastitis.

**Keywords:** Bovine, Mastitis, *S. aureus*, Virulence gene profile.

### Giriş

Mastitis, meme dokusunun ve meme bezinin bakteriyel, viral, fungal ve paraziter etkenler nedeniyle yangılanmasıdır. Enfeksiyon genellikle hijyenik ve yönetimsel uygulamaların yokluğunda, sağım sırasında enfekte ineklerden enfekte olmayan ineklere yayılabilmektedir (Kotzamanidis ve ark., 2021).

Sığır mastitislerinden en sık izole edilen etkenlerin başında *Staphylococcus (S.) aureus* gelmektedir. Etken hem insanların hem de

hayvanların derisinde, burnunda ve solunum yollarında bulunan kommensal mikrobiyotanın bir parçasını oluşturmaktadır. *S. aureus*, yüzeysel deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından yaşamı tehdit eden septisemiye kadar, birçok ciddi hastalık oluşturan bir patojendir. Diğer yandan süt endüstrisi için oldukça maliyetli klinik ve subklinik sığır mastitisinin en yaygın etiyolojik ajanıdır (Ren ve ark., 2020).



*S. aureus*, adezinler, kapsüller bir polisakkarit ve ekzoenzimler gibi çok sayıda virülens faktörü üretme kapasitesine sahiptir. Etken aynı zamanda hemolizinler, koagülaz, slime ve protein A gibi meme bezine kolonize olma kabiliyetine katkıda bulunan ekzoproteinler de üretebilmektedir.  $\alpha$  ve  $\beta$ -hemolizinler, mastitisin patogeneğinde önemli virülens faktörlerdir. *S. aureus* izolatlarının patojenitesi; adherens özellikleri, çeşitli toksinler, enzimler, yapısal ve ekstraselüler faktörler gibi özelliklerle ilişkilidir. Konakçı hücre dışı matriks bileşenlerine yapışmayı sağlamak, konakçı hücelere zarar vermek ve bağışıklık sistemini güçlendirmek için salgılanan ve hücre yüzeyiyle ilişkili virülens faktörleri enfeksiyonun gelişimine katkı sağlamaktadır. Etkenin dokulara yapışmasını sağlayan en az 25 farklı toksin, adezin matriks molekülleri ile ilişkisi olan 15 mikrobiyal yüzey bileşeni, 20 immünsüpresif molekül ve diğer birçok virülens faktörü bilinmektedir (Fursova ve ark., 2020).

*S. aureus* izolatlarının moleküler karakterizasyonunda koagülaz geni (*coa*), metisilin direnç geni (*femA*) ve termonükleaz geni (*nuc*) gibi tür spesifik genler kullanılmaktadır. Hem *coa* hem de *femA* yüksek polimorfizm gösterir ve teşhis amaçları için uygun değildir. Aksine *nuc*, hem insan hem de hayvan izolatlarında türe özgü bir markör olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca bu gen *S. aureus* suşları arasında yüksek oranda korunmaktadır (Ronco ve ark., 2018).

Bu çalışmada mastitisli sığır sütlerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarının *nuc* geni yönünden tür düzeyinde moleküler tanımlanması ve mastitisin patogeneğinde rol oynayan lökotoksin, stafilokokal klasik enterotoksin, eksofoliyatif toksin, hemolizin, adezin faktör, toksik şok sendrom toksini oluşumundan sorumlu *pvl*, *sea*, *seb*, *sec*, *eta*, *etb*, *hla*, *hlb*, *fnbA*, *fnbB*, *clfa* ve *tst* genlerimPZR ile incelenmesi amaçlandı.

## Materyal ve Metot

**Staphylococcus spp. İzolatları:** Çalışmanın materyalini Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı kültür koleksiyonu içerisinde yer alan, 2016-2020 arasında subklinik mastitisli sığırlardan izole edilmiş 140 stafilokok izolatı kullanıldı. Çalışma kapsamında kültür koleksiyonunda yer alan izolatlar kullanılması sebebiyle örnek toplama ve saha çalışması yapılmamıştır. Bu nedenle herhangi bir etik kurul iznine ihtiyaç duyulmamıştır. İzolatların canlandırılması %5 Koyun kanlı agar kullanılarak yapıldı ardından DNA ekstraksiyonunun yapılması için üreyen saf koloniler TSA'da pasajlandı.

## Moleküler İdentifikasyon

**DNA Ekstraksiyonu:** İzolatlardan bakteriyel DNA ekstraksiyonu için kaynatma yöntemi kullanıldı (Vurucu ve ark., 2019). Bu amaçla, saf kültürden 4 koloni seçilerek 200  $\mu$ l steril su içerisinde süspansiyon edildi. Örnekleri içeren süspansiyonlar 100°C'de 15 dakika kaynatıldı, 10.000 g'de 10 dakika santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kalıp DNA olarak kullanılmak üzere nanodrop spektrofotometre ile ölçülerek 50 ng/ $\mu$ l olacak şekilde ayarlanarak -20°C'de saklandı.

***S. aureus* İzolatlarının Tür Düzeyinde İdentifikasyonu:** İzolatların *S. aureus* olarak identifikasyonlarının doğrulanması amacıyla *S. aureus* spesifik *nuc* geni için PZR yapıldı (Sezener ve ark., 2019). Bu amaçla 25  $\mu$ l'lik bir PZR karışımı, DEPC-treatedwater, 1X PZR solüsyonu, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM her bir dNTP, 1,0 U Taq DNA polimeraz, 0,04  $\mu$ M primer (*nuc* 1, GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT; *nuc* 2, AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC) ve 5  $\mu$ l template DNA kullanıldı. PZR karışımları 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 58°C'de 30 saniye primer bağlanma, 72°C'de 90 dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 $\mu$ g/ml) içeren %1,5'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör (Vilber Lourmat) ile görüntüldü. Görüntüleme sonrasında *nuc* geni için 279 bp'lik bir bandın görülmesi *S. aureus*'un göstergesi olarak kabul edildi.

***S. aureus* İzolatlarının Virülens Genlerinin Belirlenmesi:** İzolatlarda, mastitisin patogeneğinde rol oynayan bazı önemli virülens genlerinin belirlenmesi amacıyla multiplex PZR (mPZR) çalışmaları yapıldı. Lökotoksin geni (*pvl*), stafilokokal klasik enterotoksin genleri (*sea*, *seb*, *sec*), eksofoliyatif toksin genleri (*eta*, *etb*), hemolizin genleri (*hla*, *hlb*), adezin faktör genleri (*fnbA*, *fnbB*, *clfa*) ve toksik şok sendrom toksin geni (*tst*) Tablo 1, Tablo 2 ve Tablo 3'de belirtilen spesifik primerler ve PZR koşulları kullanılarak incelendi. mPZR çalışmaları Li ve ark. (2018)'nin bildirdiği metodun modifikasyonu ile gerçekleştirildi. PZR koşulları: 94°C'de 5 dakika ilk denatürasyon, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, her gen için spesifik primer bağlanma (annealing) ısısında (55-56°C) 45 saniye, 72 °C'de benzer şekilde spesifik uzama zamanında 30 siklus, son uzama 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri etidumbromid (2 $\mu$ g/ml) içeren %1.5'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüldü. PZR çalışmalarında pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 23235, negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı.

**Tablo 1.** *pvl*, *etb*, *sea* ve *clfa* genleri için mPZR 1.

Gen	Primer	Nükleotid sekans (5'–3')	Ürün (bp)	Annealing ısısı	Miktar(µl)	
<i>pvl</i>	PVL-F	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	433	55°C	0.2	
	PVL-R	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC				
<i>etb</i>	ETB-F	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC	612			
	ETB-R	AGTGAACCTATCTTTCTATTGAAAAACACTC				
<i>sea</i>	SEA-F	GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA	560			
	SEA-R	CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTTC				
<i>clfa</i>	CLFA-F	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	292			
	CLFA-R	CGTTTCTCCGTAGTTGCATTTG				
					Master mix	12.5
					Steril distile su	8.7
					Template DNA	2
					<b>Toplam hacim</b>	<b>25</b>

**Tablo 2.** *sec*, *tst*, *seb* ve *eta* genleri için mPZR 2.

Gen	Primer	Nükleotid sekans (5'–3')	Ürün (bp)	Annealing ısısı	Miktar(µl)	
<i>sec</i>	SEC-F	GTAAAGTTACAGGTGGCAAAACTTG	297	56°C	1	
	SEC-R	CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT				
<i>tst</i>	TST-F	TTCATATTTGTAAAAGTGTGACACCCACT	180			
	TST-R	TACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTT				
<i>seb</i>	SEB-F	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA	404			
	SEB-R	ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT				
<i>eta</i>	ETA-F	CGCTGCGGACATTCTACATGG	676			
	ETA-R	TACATGCCCGCCACTTGCTTGT				
					Master mix	25
					Steril distile su	17.8
					Template DNA	2
					<b>Toplam hacim</b>	<b>50</b>

**Tablo 3.** *fnbB*, *fnbA*, *hla* ve *hly* genleri için mPZR 3.

Gen	Primer	Nükleotid sekans (5'–3')	Ürün (bp)	Annealing ısısı	Miktar(µl)	
<i>fnbA</i>	FNBA-F	GTGAAGTTTTAGAAGGTGGAAAGATTAG	643	56°C	0.4	
	FNBA-R	GCTCTTGTAAGACCATTTTTCTCAC				
<i>fnbB</i>	FNBB-F	GTAACAGCTAATGGTCTGAATTGATACT	524			
	FNBB-R	CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC				
<i>hla</i>	HLA-F	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	209			
	HLA-R	CTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT				
<i>hly</i>	HLB-F	GTGCACTTACTGACAATAGTGC	309			
	HLB-R	GTTGATGAGTAGCTACCTCAGT				
					Master mix	12.5
					Steril distile su	7.3
					Template DNA	2
					<b>Toplam hacim</b>	<b>25</b>

Tablo 4. *S. aureus* izolatlarında belirlenen virülens genlerin dağılımı.

İzolat no	Virülens Genleri											
	<i>clfa</i>	<i>hla</i>	<i>hly</i>	<i>fnbB</i>	<i>fnbA</i>	<i>etb</i>	<i>sec</i>	<i>tst</i>	<i>sea</i>	<i>pvl</i>	<i>eta</i>	<i>seb</i>
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
12	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
18	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
20	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
22	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
27	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
28	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
32	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
34	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
37	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
39	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
40	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
42	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Toplam</b>	<b>30</b>	<b>24</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>%</b>	<b>71.4</b>	<b>57.1</b>	<b>33.3</b>	<b>23.8</b>	<b>14.2</b>	<b>14.2</b>	<b>11.9</b>	<b>11.9</b>	<b>7.1</b>	<b>4.7</b>	<b>2.3</b>	<b>0</b>

**Tablo 5.** *S. aureus* izolatlarında belirlenen çoğul virülens gen profili.

Çoğul Virülens Genler	İzolat sayısı
<i>clfa+hla+hly+fnbB+etb+tst</i>	1
<i>clfa+hla+hly+fnbB+fnbA</i>	1
<i>clfa+hla+hly+fnbA+sea</i>	1
<i>clfa+hla+hly+fnbB</i>	6
<i>clfa+hla+hly+pvl</i>	1
<i>clfa+hla+hly+sea</i>	2
<i>clfa+fnbA+etb</i>	1
<i>clfa+hla+fnbB</i>	2
<i>clfa+hla+tst</i>	2
<i>clfa+hla+fnbA</i>	2
<i>clfa+etb+sec</i>	1
<i>clfa+hla+hly</i>	2
<i>clfa+hla+pvl</i>	1
<i>clfa+eta</i>	1
<i>clfa+hla</i>	3
<i>fnbA+etb</i>	1
<i>etb+sec</i>	1
<b>Toplam</b>	<b>29</b>

## Bulgular

### *S. aureus* İzolatlarında *nuc* Geni Hedefli PZR

**Sonuçları:** Mevcut *S. aureus* izolatlarının genotipik identifikasyonunun belirlenmesi için toplam 140 stafilkok izolatının termonükleaz (*nuc*) geni varlığı PZR ile incelendi. *nuc* genine spesifik primerle yapılan PZR sonrasında, 42 izolatta 279 bp'lik PZR ürünü elde edilip izolatların *S. aureus* oldukları belirlendi (Şekil 1).



**Şekil 1.** *S. aureus* izolatlarının *nuc* geni spesifik PZR ürünü. M: Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya). 1,2,3,5,6: *nuc* geni pozitif (279 bp) örnekler. 4: Negatif örnek. 7: Pozitif kontrol (*S. aureus* 23235) 8: Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922).

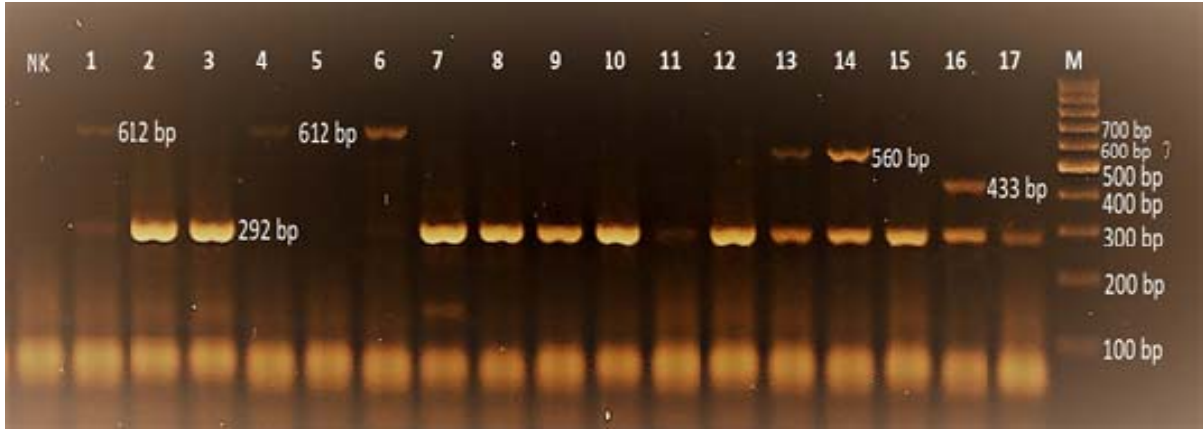
***S. aureus* İzolatlarında Virülens Gen Profili:** Bu çalışmada *nuc* geni ile *S. aureus* oldukları

doğrulanmış 42 izolatın lökotoxin geni (*pvl*), stafilkokal klasik enterotoksin genleri (*sea*, *seb*, *sec*), eksfoliyatif toksin genleri (*eta*, *etb*), hemolizin genleri (*hla*, *hly*), adezin faktör genleri (*fnbA*, *fnbB*, *clfa*) ve toksik şok sendrom toksin geni (*tst*) varlığı 3 farklı mPZR ile incelendi. *pvl*, *etb*, *sea* ve *clfa* genlerine ait mPZR 1 sonuçları Şekil 2, *sec*, *tst*, *seb* ve *eta* genleri için mPZR 2 sonuçları Şekil 3 ve *fnbB*, *fnbA*, *hla* ve *hly* genleri için mPZR 3 sonuçları Şekil 4'de gösterildi.

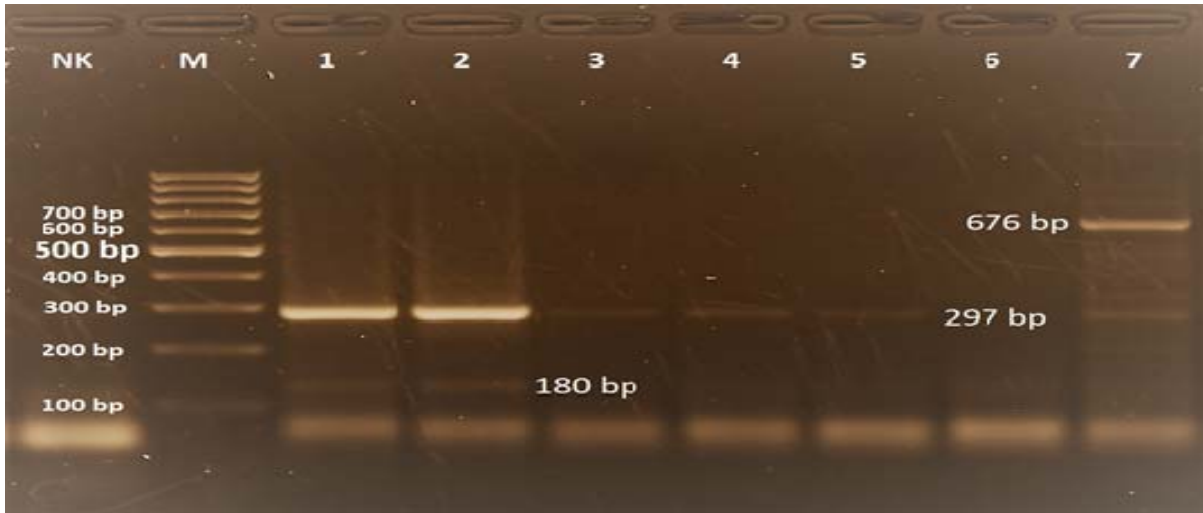
İzolatların 30 (%71,4)'unda *clfa*, 24 (%57,1)'ünde *hla*, 14 (%33,3)'ünde *hly*, 10 (%23,8)'unda *fnbB*, 6 (%14,2)'sında *fnbA*, 6 (%14,2)'sında *etb*, 5 (%11,9)'inde *sec*, 5 (%11,9)'inde *tst*, 3 (%7,1)'ünde *sea*, 2 (%4,7)'sinde *pvl* ve 1 (%2,3)'inde *eta* geni tespit edildi. İzolatların hiçbirinde *seb* geni saptanamadı (Tablo 4, Şekil 5). İzolatların 29'unda, 17 farklı virülens gen profilinden oluşan, iki ya da daha fazla virülens gene çoğul pozitiflik belirlendi (Tablo 5).

## Tartışma ve Sonuç

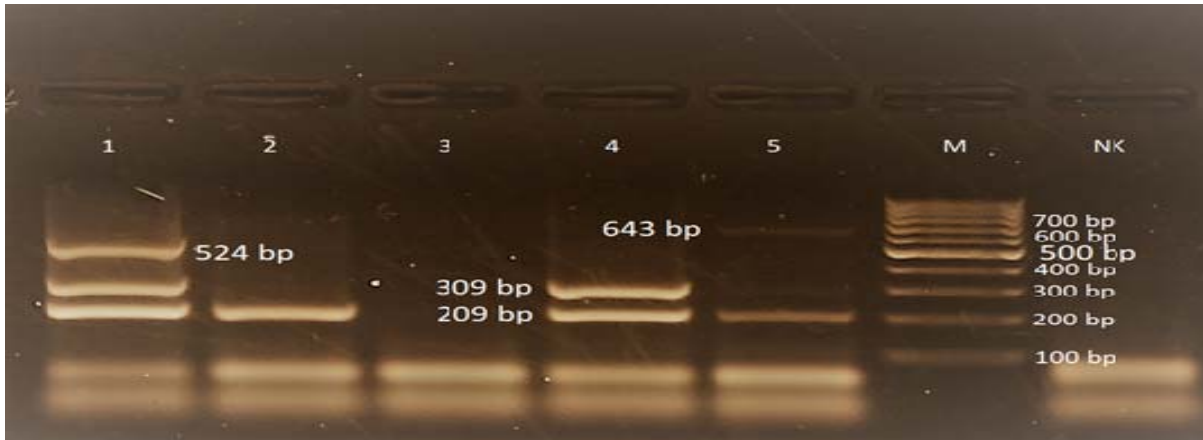
*S. aureus* nedenli mastitis oluşumu farklı patojenez mekanizmalarına sahip enterotoksinler, hemolizinler, clumping faktör, fibrinolektin bağlayan proteinler gibi çeşitli virülens faktörlerin üretimine bağlıdır (Boynukara ve ark., 2008). *S. aureus* suşlarının patojenisitesindeki farklılıklar coğrafi dağılımdan, konakçı ve doku ile ilgili özelliklerden kaynaklanmaktadır. Virülens genlerinin sayısı ve kombinasyonu, *S. aureus* suşlarının patojenik potansiyeline önemli katkılar sağlamaktadır (Kot ve ark., 2016).



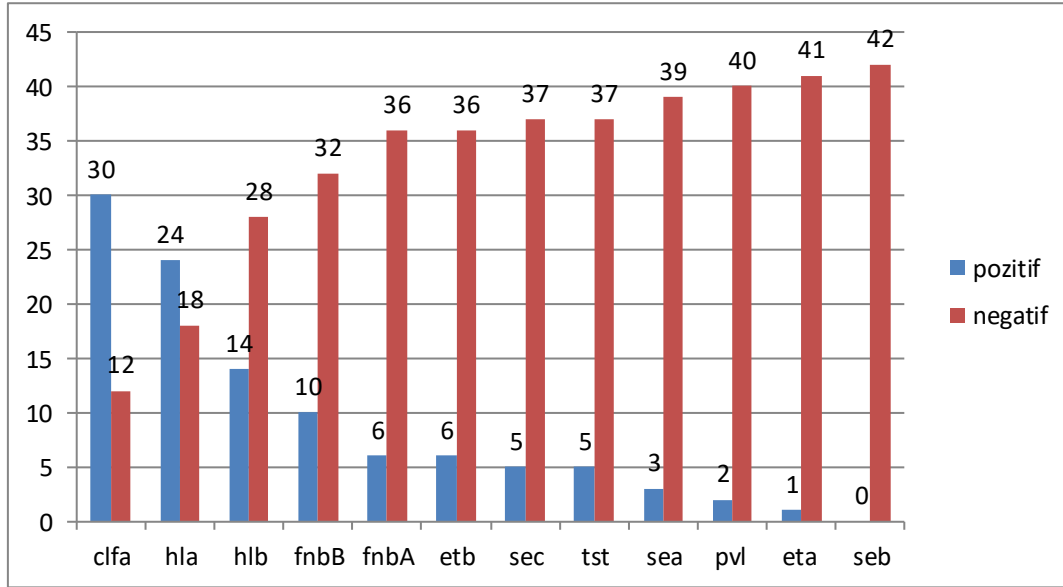
**Şekil 2.** *pvl*, *etb*, *sea* ve *clfa* genlerine ait mPZR 1 sonuçları. M: Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya). NK: Negatif kontrol (DNase-RNasefree PZR suyu); 1: *clfa* ve *etb* genleri (292 bp ve 612 bp) pozitif örnekler; 2,3,7,8,9,10,11,12,15,17: *clfa* geni (292 bp) pozitif örnekler; 4 ve 6: *etb* geni (612 bp) pozitif örnekler; 5: tüm genler (*pvl*, *etb*, *sea* ve *clfa*) açısından negatif örnek; 13 ve 14:*clfa* ve *sea* genleri (292 bp ve 560 bp) pozitif örnekler; 16: *clfa* ve *pvl* genleri (292 bp ve 433 bp) pozitif örnek.



**Şekil 3.** *sec*, *tst*, *seb* ve *eta* genleri için mPZR 2 sonuçları. M: Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya). NK: Negatif kontrol (DNase-RNasefree PZR suyu); 1,2: *sec* ve *tst* genleri (297 bp ve 180 bp) pozitif örnekler; 3,4,5: *sec* geni (297 bp) pozitif örnek; 7: *eta* geni (676 bp) pozitif örnek; 6: tüm genler (*sec*, *tst*, *seb* ve *eta*) açısından negatif örnek.



**Şekil 4.** *fnbB*, *fnbA*, *hla* ve *hlb* genleri için mPZR 3 sonuçları. M: Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya). NK: Negatif kontrol (DNase-RNase free PZR suyu); 1: *hla* (209 bp), *hlb* (309 bp) ve *fnbB* (524 bp) genleri pozitif örnek; 2: *hla* (209 bp) pozitif örnek; 3: tüm genler (*fnbB*, *fnbA*, *hla* ve *hlb*) açısından negatif örnek; 4: *hla* (209 bp) ve *hlb* (309 bp) genleri pozitif örnek; 5: *hla* (209 bp) ve *fnbA*(643 bp) genleri pozitif örnek.



Şekil 5. *S. aureus* izolatlarında belirlenen virülens genlerin dağılımı.

Siğir mastitislerinin etiolojisinde önemli yer tutan *S. aureus*'un virülens genlerinin ortaya konulması ve patogeneze önemli rol oynayan faktörlerin karakterizasyonu amacıyla çok sayıda araştırma yapılmıştır.

Bu çalışmalarda incelenen *S. aureus* izolatlarında sıklıkla belirlenen virülens genlerinin *cfa* (Fursova ve ark., 2020; Ote ve ark., 2011; Xu ve ark., 2015; Yang ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2018 ), *hla* (Artursson ve ark., 2016; Fursova ve ark., 2018; Kreausukon ve ark., 2012; Ronco ve ark., 2018; Wang ve ark., 2016 ), *sea* (Grispoldi ve ark., 2019; Liu ve ark., 2017; Seyoum ve ark., 2016 ), *fnbA* (Pereyra ve ark., 2016; Yang ve ark., 2012; Zuniga ve ark., 2015), *fnbB* (Bar-Gal ve ark., 2015; Kot ve ark., 2016), *pvl* (Wang ve ark., 2014) *tst* (Wang ve ark., 2017) *sec* (Kotzamanidis ve ark., 2021) olduğu bildirilmiştir. Araştırmalarda *S. aureus* kökenli siğir mastitislerinin patogenezinde bu genlerin önemli rol oynadığına dikkat çekilmiştir.

Konuyla ilgili farklı ülkelerde siğir mastitis vakalarından izole edilen *S. aureus* izolatlarında virülens genlerin tespitine yönelik yapılan çalışmalarda patogeneze rol oynayan faktörlerin çok değişken olduğu ortaya konulmuştur. Bazı çalışmalarda primer olarak belirlenen genlerin *cfa* ve *hla* olduğu görülmektedir. Bu çalışmada incelenen *S. aureus* izolatlarında belirlenen en önemli virülens genlerinin *cfa* ve *hla* olması literatür verileriyle paralellik göstermektedir (Coelho ve ark., 2011; Fitzgerald ve ark., 2000; Monecke ve ark., 2007; Oteve ark., 2011). Araştırma verileri arasındaki farklılıklar bölgesel, metodik, izolat sayısı ve çeşitliliği, popülasyon yapısı gibi birçok faktöre bağlı şekillenebilmektedir. Diğer yandan pek çok araştırma verilerinde sunulduğu

gibi, siğir mastitislerinin oluşumuna katılan *S. aureus* izolatlarının farklı virotiplere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle siğir mastitislerinin etiolojisini detaylı bir şekilde ortaya koymak için, daha kapsamlı epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Böylece siğir mastitislerin önlenmesinde koruyucu aşılama programları ve daha kapsamlı aşı içeriklerinin hazırlanması mümkün olabilecektir.

Bu çalışmada siğir mastitislerinden izole edilen ve *nuc* geni pozitif 42 *S. aureus* izolatı 12 farklı virülens geni açısından mPZR ile incelendi. 42 *S. aureus* izolatının 38'inde bir ya da daha fazla virülens geni belirlenirken, 4 izolatta incelenen virülens genlerin hiçbiri saptanamadı. İncelenen izolatlarda en fazla tespit edilen virülens genlerin *cfa* ve *hla* olduğu görüldü. İzolatların 29'unda iki ya da daha fazla virülens gen açısından çoğul pozitiflik belirlendi. Çoğul pozitiflik belirlenen izolatların 6'sının 4 gen (*cfa+hla+hlb+fnbB*) açısından birlikte pozitif olduğu görüldü. Diğer yandan bir izolatta 6 (*cfa+hla+hlb+fnbB+etb+tst*), birer izolatta 5 (*cfa+hla+hlb+fnbB+fnbA* ve *cfa+hla+hlb+fnbA+sea*) farklı virülens genin birlikte var olduğu tespit edildi. Araştırılan virülens genleri açısından negatif bulunan izolatlarda mastitis oluşumundan sorumlu başka virülens faktörlerinin var olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak bu çalışma ile sınırlı dahi olsa siğir mastitislerinin patogenezinde rol oynayan virülens gen paternleri ortaya konuldu. Çalışma sonuçlarının siğir mastitislerinin etiolojisinde önemli rol oynayan *S. aureus*'a ait virülens faktörlerinin karakterizasyonu çalışmalarına katkı sağlayacağı kanaatine varıldı. Siğir mastitislerinin önlenmesine yönelik hazırlanacak aşı kompozisyonunun

şekillendirilmesinde *S. aureus* virülens gen çeşitliliğinin bilinmesi önem arz etmektedir. Bu nedenle kullanılacak aşının çok sayıda virülens faktörüne sahip suşlardan oluşturulması gerekmektedir. Bu çalışmada incelenen *S. aureus* izolatlarının çoğunun farklı virülens gen profiline sahip olması, izolatların aşı suşu olarak kullanılabilir potansiyelde olduğunu göstermektedir. Ancak izolatların aşı suşu potansiyelinin tam olarak ortaya konulması için ileri seviyede karakterizasyon çalışmaları yapılmalıdır. Sığır mastitislerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının mastitis patogenezesinde rol oynayan virülens gen çeşitliliğinin ortaya konulması amacıyla daha fazla izolat içeren epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

### Teşekkür

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından PYO.VET.1904.20.015 nolu proje kapsamında maddi olarak desteklenmiş ve aynı isimli yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

### Kaynaklar

- Artursson K, Söderlund R, Liu L, Monecke S, Schelin J, 2016: Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. *Vet Microbiol*, 193, 156-161.
- Bar-Gal GK, Blum SE, Hadas L, Ehrlich R, Monecke S, Leitner G, 2015: Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. *Vet Microbiol*, 176,143-154.
- Boynukara B, Gulhan T, Alisarli M, Gurturk K, Solmaz H, 2008: Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *Int J Food Microbiol*, 125(2), 209-211.
- Coelho SMO, Pereira IA, Soares LC, Pribul BR, Souza MMS, 2011: Short communication: Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J Dairy Sci*, 94, 3305-3310.
- Fitzgerald JR, Hartigan PJ, Meaney WJ, Smyth CJ, 2000: Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *J Appl Microbiol*, 88, 1028-1037.
- Fursova KK, Shchannikova MP, Loskutova IV, Shepelyakovskaya AO, Laman AG, Boutanaev AM, Sokolov SL, Artemeva OA, Nikanova DA, Zinovieva NA, Brovko FA, 2018: Exotoxin diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with subclinical mastitis in Central Russia. *J Dairy Sci*, 101, 4325-4331.
- Fursova, K, Sorokin A, Sokolov S, Dzhelyadin T, Shulcheva I, Shchannikova M, Nikanova D, Artemeva O, Zinovieva N, Brovko F, 2020: Virulence factors and phylogeny of *Staphylococcus aureus* associated with bovine mastitis in Russia based on genome sequences. *Front Vet Sci*, 7(135), doi: 10.3389/fvets.2020.00135.
- Grispoldi L, Massetti L, Sechi P, Iulietto MF, Ceccarelli M, Karama M, Popescu PA, Pandolfi F, Cenci-Goga BT, 2019: Short communication: Characterization of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *J Dairy Sci*, 102, 1059-1065.
- Kot B, Szewda P, Frankowska-Maciejewska A, Piechota M, Wolska K, 2016: Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. *J Dair Res*, 83, 228-235.
- Kotzamanidis C, Vafeas G, Giantzi V, Anastasiadou S, Mygdalias S, Malousi A, Loukia E, Daniel S, Zdragas A, 2021: *Staphylococcus aureus* isolated from ruminants with mastitis in Northern Greece dairy herds: genetic relatedness and phenotypic and genotypic characterization. *Toxins*, 13 (3), 176, <https://doi.org/10.3390/toxins13030176>.
- Krausukon K, Fetsch A, Kraushaar B, Alt K, Müller K, Krömker V, Zessin KH, Käsbohrer A, Tenhagen BA, 2012: Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. *J Dairy Sci*, 95, 4382-4388.
- Li X, Fang F, Zhao J, Lou N, Li C, Huang T, Li Y, 2018: Molecular characteristics and virulence gene profiles of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infection. *Braz J Infect Dis*, 22, 487-494.
- Liu H, Li S, Meng L, Dong L, Zhao S, Lan X, Wang J, Zheng N, 2017: Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in northern China. *J Dairy Sci*, 100, 8796-8803.
- Monecke S, Kuhnert P, Hotzel H, Slickers P, Ehrlich R, 2007: Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Vet Microbiol*, 125, 128-140.
- Ote I, Taminiau B, Duprez JN, Dizier I, Mainil JG, 2011: Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 153, 285-292.
- Pereyra EAL, Picech F, Renna MS, Baravalle C, Andreotti CS, Russi R, Calvino LF, Diez C, Dallard BE, 2016: Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol*, 183, 69-77.
- Ren Q, Liao G, Wu Z, Lv J, Chen W, 2020: Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. *J Dairy Sci*, 103(4), 3368-3380.
- Ronco T, Klaas IC, Stegger M, Svenes L, Astrup LB, Farre M, Pedersen K, 2018: Genomic investigation of *Staphylococcus aureus* isolates from bulk tank milk

- and dairy cows with clinical mastitis. *Vet Microbiol*, 215, 35-42.
- Seyoum ET, Mekonene TK, Woldetsadik DA, Zewudie BM, Gebreyes WA, 2016: Enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine milk produced in central Ethiopia. *J Infect Dev Cttries*, 10(2), 138-142.
- Sezener MG, Fındık A, Ergüden VE, Akgöz S, Gülhan T, Çiftci A, 2019: Mastitis izolatu *Staphylococcus aureus* suşlarında antibiyotik dirençliliğinin ve bazı virülens genlerinin araştırılması. *J Anatol Environ Animal Sci*, 4(2), 182-187.
- Vurucu N, Savaşan S, Sezener MG, 2019: Determination of virulence genes and genetic similarities of mastitis milk originated *Escherichia coli* isolates. *East African Scholars J Agri Life Sci*, 2(1), 31-35.
- Wang D, Zhang L, Zhou X, He Y, Yong C, Shen M, Szenci O, Han B, 2016: Antimicrobial susceptibility, virulence genes, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from bovine mastitis in Ningxia, China. *J Dairy Sci*, 99, 9560-9569.
- Wang D, Zhang L, Yong C, Shen M, Ali T, Shahid M, Han K, Zhou X, Han B, 2017: Relationships among superantigen toxin gene profiles, genotypes, and pathogenic characteristics of *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci*, 100(6), 4276-4286.
- Wang X, Wang X, Wang Y, Guo G, Usman T, Hao D, Tang X, Zhang Y, Yu Y, 2014: Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. *Lett Appl. Microbiol*, 58, 527-534.
- Xu J, Tan X, Zhang X, Xiaoli X, Sun H, 2015: The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. *Microb Pathog*, 88, 29-38.
- Yang FL, Li XS, Liang XW, Zhang XF, Qin GS, Yang BZ, 2012: Detection of virulence associated genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis milk samples in Guangxi. *Trop Anim Health Prod*, 44, 1821-1826.
- Yang F, Zhang S, Shang X, Li H, Zhang H, Cui D, Wang X, Wang L, Yan Z, Sun Y, 2020: Detection and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China. *J Dairy Sci*, 103, 840-845.
- Zhang L, Gao J, Barkema HW, Ali T, Liu G, Deng Y, Naushad S, Kastelic JP, Han B, 2018: Virulence gene profiles: alpha-hemolysin and clonal diversity in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine clinical mastitis in China. *Vet Res*, 14(63), <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1374-7>.
- Zuniga E, Melville PA, Saldenbergs ABS, Laes MA, Gonsales FF, Salaberry SRS, Gregori F, Brandao PE, dos Santos FGB, Lincopan NE, Benites NR, 2015: Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus spp.* isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. *Microb Pathog*, 89, 1-6.

## \*Yazışma Adresi: Timur GÜLHAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.

e-mail: timur.gulhan@omu.edu.tr



## An Analysis on Migratory Beekeeping in Inner-West Anatolia Region, Afyonkarahisar, Turkey: Production, Practice, Marketing, and Challenges

Ahmet AKPINAR<sup>1,a</sup>, Zehra BOZKURT<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Afyonkarahisar Provincial Directorate of Agriculture and Forestry, Afyonkarahisar, Turkey

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

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0001-6310-5297, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0001-8272-7817

Geliş Tarihi: 16.08.2021

Kabul Tarihi: 27.10.2021

**Abstract:** This study aimed to analyze the challenges of migratory beekeeping enterprises related to their production capacity, beekeeping practices and, marketing in Afyonkarahisar. Some observations, measurements, and apiary land-based assessments were made in a total of 84 beekeeping enterprises that have been selected randomly with a stratified sampling method. Data from face-to-face interviews with beekeepers and production records on the farms were used via a semi-structured form. While there was a traditional honey production model in these enterprises, the average hive capacity was 323.98 units. It is determined that the average honey production per hive was 14.28 kg and, there was an increasing trend in production parallel to enterprise capacity. All enterprises have Muğla and Muğla x Anatolian hybrid bee colonies. Beekeepers reported that the most critical colony losses were originated from Nosema and Varroa infections, and most of the hives evaluated were more or less dirty and worn. It has revealed that there was no record kept of any bee health and production in many enterprises, and there was no plan for natural disasters in many apiary areas for emergencies. It has been concluded that honey yield increased with the enterprise size, the hives were dense in the apiary land, the amount of dirty and worn hives was high, and the major problems were related to bee transportation, shelter, marketing, and bee diseases.

**Keywords:** Afyonkarahisar, Challenges, Marketing, Migratory beekeeping, Production, Turkey.

### İç-Batı Anadolu Bölgesi, Afyonkarahisar, Türkiye'de Göçmen Arıcılık Üzerine Bir Analiz: Üretim, Uygulamalar, Pazarlama ve Zorluklar

**Özet:** Bu çalışmada, Afyonkarahisar'da faaliyet gösteren gezginci arıcılık işletmelerinin üretim kapasitesi, arıcılık ve pazarlama uygulamaları ile karşılaştıkları zorlukların analiz edilmesi amaçlanmıştır. Afyonkarahisar'da bulunan arıcılık işletmelerinin coğrafi dağılımı dikkate alınarak tabakalı örnekleme yapılan ve rastgele seçilen toplam 84 arıcılık işletmesine ait arılıklarda inceleme, gözlem, ölçüm ve değerlendirme yapılmıştır. Arıcılar ile yapılan yüz yüze görüşmeler ve işletme kayıtlarından elde edilen veriler yarı yapılandırılmış bir form ile kayıt altına alınmıştır. Bu işletmelerde geleneksel bal üretilmekte olup ortalama kovan kapasitesi 323,98 adettir. Ortalama 14,28 kg olan kovan başına bal üretiminin işletme büyüklüğü arttıkça arttığı tespit edilmiştir. Tüm işletmelerde Muğla ve Muğla x Anadolu melezi bal arıları bulunmaktadır. Arıcılar koloni kayıplarının en fazla Nosema ve Varroa kaynaklı olduğunu bildirmiştir ve kovanların yaklaşık üçte birinin kirli ve yıpranmış olduğunu belirlenmiştir. Birçok işletmede üretim verileri ve arı sağlığına ilişkin kayıtların tutulmadığı ve arılık alanlarında doğal afetlere karşı acil durum planının bulunmadığı tespit edilmiştir. İşletme büyüklüğü ile bal veriminin arttığı, arılıktaki kovanların sıkışık bulunduğu, kirli ve yıpranmış kovan miktarının fazla olduğu ve önemli sorunların arı taşıma, konaklama, pazarlama ve arı hastalıklarına ilişkin olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Afyonkarahisar, Gezginci arıcılık, Pazarlama, Türkiye, Üretim, Zorluklar.

### Introduction

The extract and pollens taken from plants and flowers are processed by the bees and turned into valuable products such as honey, propolis, bee swarm, and beeswax. Beekeeping provides many benefits that have not been fully discovered yet, such as the support it provides to gastronomy, tourism, apitherapy and ecosystem health (Bozkurt 2019; Onbaşı et al., 2019; Şahingöz and İnci, 2018). In 2019, 1.852.598 tons of honey were produced globally, and 109.330 tons of honey were produced in Turkey, and, in 2020, 1.031 tons of honey were

produced with 57.836 hives in 316 enterprises Afyonkarahisar (Anonymous, 2021).

Afyonkarahisar, located in the Inner Western Anatolia Region, has a rich flora with industrial plants such as poppy, pulses, sugar beet, various horticultural crops, and fruit production such as cherries, sour cherries, plums on a total agricultural area of 3.503.724 decares and honey forests and pastures (Anonymous, 2001a). Environmental pollution and the use of artificial fertilizers are also low in the province (Anonymous, 2020). Due to its

favorable vegetation, pollen, nectar potential, and beekeeping culture, Afyonkarahisar is also an essential destination in spring for pine honey producers who want to strengthen their colonies and make a good start (Karahana et al., 2019).

The contribution of migratory beekeeping in total honey production in Turkey is significant (GEKA, 2019; Topal et al., 2019;). However, beekeepers face many problems in the migration the route they follow, such as inadequate floral capacity, a high number of beekeepers staying in the same area, accommodation permits, hive transport, and risks for bee health (Karahana et al., 2019; Şeker et al., 2017). More research is needed on the capacity, production performance, bee transport, bee and equipment characteristics, and bee management practices of migratory beekeeping enterprises to create a primary data set for local and national strategies. New scientific researches are also needed to solve these problems (Topal et al., 2016; Uzundumlu et al., 2011). So, this study was carried out to analyze the production capacity, beekeeping practices, and marketing problems of migratory beekeeping enterprises in Afyonkarahisar.

## Materials and Methods

**Methods for sampling, data collection, and apiary land assessment:** The population of this research consists of 1915 migratory Beekeeping enterprises operating in Afyonkarahisar province. In the study, the sample was taken due to constraints such as time, cost, and distance. In this regard, the enterprises were determined by the stratified sampling method considering the density regarding the geographical distribution of migratory beekeeping enterprises in Afyonkarahisar (Ural and Kılıç, 2013). The formula suggested by Sekaran (2003) for quantitative research was used in determining the sample size. The formula is given below;

$$n = \frac{N \cdot P \cdot Q \cdot Z_{\alpha}^2}{(N-1) \cdot d^2 + P \cdot Q \cdot Z_{\alpha}^2}$$

From the parameters in the formula, N=1915, P=50%, Q=50%, the theoretical value corresponding to the significance level of 0.05  $Z_{\alpha}=1.96$ , d=10% is taken, and the minimum sample size was calculated as 92. In this context, data were collected from 92 enterprises, and the data were judged to be complete and reliable from 84 businesses, and statistical analyses were made on this sample.

Data was formed by on-apiary land assessments, some measurements, and observations conducted in apiary lands and the information received from the beekeepers' face-to-face interviews and enterprise records. During the

apiary land visits, all the hives were counted (old, new, empty, or with a colony), honey bee ecotype, harvesting method, bee products, type, and number of vehicles used for bee transportation and beekeepers' travel routes were determined. The quality condition and cleanliness of the hives and beekeeping equipment were also evaluated. Moreover, hive bottom board height, the distances between hive rows, and between beehives positioned side by side on the same row were measured. Vegetation in terms of nectar and pollen sources on the surrounding land of apiaries were also observed and evaluated. The record kept in beekeeping enterprises related to diseases, treatments, preventive health measures, and production performance was examined. The beehives and honey yield ratio per hive were evaluated by grouping according to the enterprise-scale (1-50, 151-300, 301-450, and >451 hives in groups 1, 2, 3, 4, respectively). Information about bee temperament and aggressiveness, preventive practices for bee aggressiveness, colony care, queen bees, and marketing practices were obtained from beekeepers. In these interviews, information about ownerships of bee transport and travel vehicles, drivers, bee transport practices, ownership of apiaries, insurance of vehicles and hives and, residue and quality control tests in honey were also obtained. In addition, the information about bee diseases and pests observed in the enterprise and the precautions to support bee health were recorded. By using the records of beekeeping in enterprises, if there are any, or by using the data obtained from the beekeepers, if not, data on previous year's production of honey, pollen, beeswax and propolis, annual bee transport distance and fuel expense, and prices of bee products were collected. A semi-structured form has been developed for data collection and data recording processes. Institutional Animal Care and Use Committee has approved this study (Ref. No: AKUHADYEK-140-18).

**Statistical Analysis:** Descriptive statistics such as frequency, percentage distribution, arithmetic mean, and standard error were applied. Obtained data were analyzed using SPSS 18.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago).

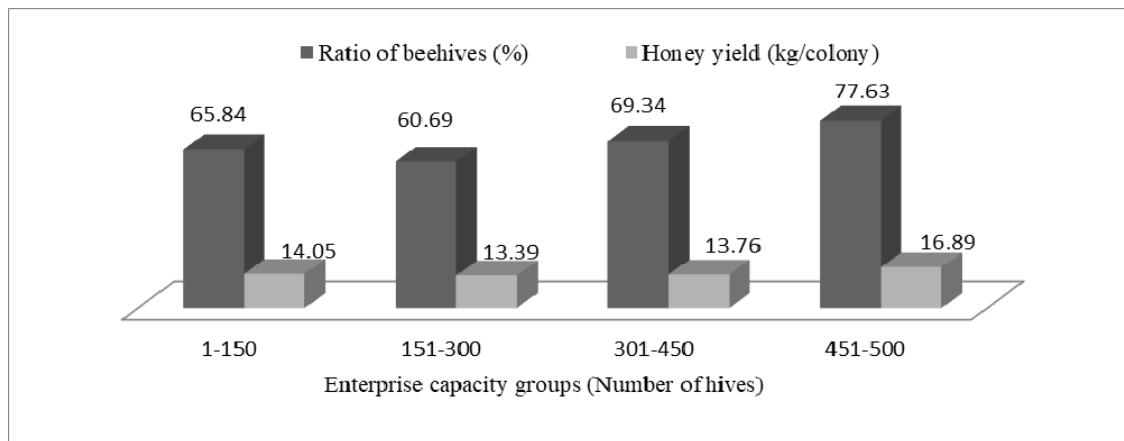
## Results

The results on the scale of the enterprise and honey bee temperament and the beekeeping practices such as queen bee management, hive inspection, bee care, and honey harvesting were given in Table 1. It was determined that the enterprises were registered in beekeeping registration system, and were members of Muğla

Beekeepers' Association (46.40%) and Afyonkarahisar Beekeepers' Association (53.60%).

Statistical results related to annual honey, pollen, beeswax, and propolis production levels in beekeeping enterprises were presented in Table 2. The ratios of beekeepers reported that they were producing honey, pollen, beeswax, and propolis were 100.0, 28.57, and 15.48%, respectively, and only 1.19% of beekeepers stated that they were producing royal jelly. It is determined that the number of beehives with a colony and honey yield showed an increasing trend along with enterprise capacity (Figure 1). The type and ownership of

transport vehicles, insurance details, marketing, and honey quality monitoring in the beekeeping enterprises were given in Table 3. Results were also presented related to producer prices and quality monitoring strategies for bee products, marketing channels, insurance, and honey quality monitoring. It has been revealed that 69.00% of beekeepers used bank loans to cover their operating costs, and 22.60% of those were benefited from beekeeping grant support. The study determined that beekeeping was carried out in an average of 3.13 different apiary locations during the honey season, which lasted for an average of 258.04 days.



**Figure 1.** The ratios of beehives having a colony and honey yield per beehive by enterprise capacity groups.

The results of the apiary land-based assessment related to the traits of beehives, beekeeping equipment, and the apiary lands of the enterprises were given in Table 4. The annual losses related to bee diseases and pests, bee colony problems, cleaning and disinfection practices, and record-keeping in the enterprise were also given in the same table.

## Discussion and Conclusion

The beekeeping establishments visited in Afyonkarahisar city center and its districts were all the members of Afyonkarahisar and Muğla Beekeepers' Union and were engaged in migratory beekeeping. The average hive capacity of beekeeping enterprises was 323.98, and 51.19% have more than 301 hives. In other words, these enterprises were medium and large-sized (GEKA 2019) and migratory beekeeping enterprises (Karaca and Özince, 2019). These average enterprises capacity was higher than the values of Öztürk (2017) for Muğla (average of 258 hives) and of Karahan (2019) for Afyonkarahisar (32% in the group of >201 hives). Bee aggression reported by beekeepers is undesirable bee behavior. This

aggression maybe related to the genotypic weight of the Muğla bee in the honey bee colonies because Akyol et al. (2003) determined that the Muğla queen bee colonies and their hybrids were more aggressive than the other. About this issue, some beekeepers apply some preventive measures such as collapsing and narrowing of the hive entrance, manipulating the feeding time (Doğaroğlu, 2009), and changing the location of the hives on the apiary land. It is thought that bee aggression in this study may arise from the hive location in apiary land (the distance between hives and rows was 19.26 cm and 5.30 m, respectively). As supporting these results, Forfert et al. (2015) reported a relationship between inter-hive distance at the apiary land and drifting of workers.

According to beekeepers and production records, the average honey yield of the enterprises per hive was calculated as 14.28 kg. This level of productivity was close to the Turkey average (14.36 kg) but lower than the world average (20.10 kg) (Anonymous, 2020; Anonymous, 2021). However, this productivity was similar with the values (13.44 kg-19.27 kg) reported for the Aegean region (Paksoy et al., 2016; Onuç et al., 2019; Özbilgin et al., 1999), while higher than the averages of 11-15 kg reported

**Table 1.** The results related to hive capacity, honey bee traits. and the practices related to bee feeding and honey harvesting.

Factors	Variables	Results
Enterprise	Number of new hives	317.02 ± 18.92
Capacity	Numer of empty hives	96.87±9.36
	Number of beehives	220.15±17.18
	Number of damaged and worn-out hives	6.96±4.44
	Number of empty hives	1.25±0.88
	Number of beehives	5.71±3.88
	Total number of beehives	225.87±17.12
	Total number of empty hives	98.12±9.60
	Ratio of beehives (%)	67.70 ±23.52
Honeybees	Ecotypes of honeybees	Mugla honey bees (Western Anatolia) (45.24%) Anatoliaca honey bees (Central anatolia) (3.57%) Caucasian honey bees (3.57%), Carniolan honeybees (1.19%) Italian honeybees (2.38%) Mugla x Anatoliaca cross Honey bees (38.10%) Caucasian x Carniolan cross Honey bees (3.57%) Italian x Carniolan Cross Honey bees (2.38%)
Bee Temperament	Honeybee colony personality	Calm (14.30%), aggressive (85.70%)
	Aggressiveness in collective foraging behavior	Aggression (83.33%), No aggression (16.67%)
	Preventive practices for bee aggressiveness	Narrowing the hive entrance (16.70%) Replacing the hives (46.30%) Manipulating the feeding time (11.90%) Reducing beekeeping visits (1.20%) No app is helpful (2.40%) Division or combine of colonies (3.60%) Replacement of the bee yard (1.20%)
Queen bee	Procurement of queen bee	Queens are produced on the enterprises (84.52%) Queens are purchased from queen bee enterprises in Muğla (4.77%), Antalya (3.57%), Hatay (1.19%), Artvin (3.57%), and Ankara (2.38%)
	Frequency of requeening	Once per year (8.30%), once per 2 years (88.10%), once per 3 years (3.60%)
Hive inspection frequency (montly)	Brood box	5.96±0.39
	Honey box	5.82±0.41
Winter honey bee feeding	Number of honeycombs used (number/hive)	2.98±0.16
	Number of bees in the colonies	42321.43± 967.21
Spring honey bee feeding	Amount of suger used for syrup feeding (kg/hive/year)	6.61± 0.37
Autumn honey bee feeding	Amount of suger used for syrup feeding(kg/hive/year)	3.10± 0.23
	Total of annual suger used for feeding(kg/hive/year)	9.82± 0.56
Harvesting honey	Harvesting season	Between August and October (100.0%)
	Harvesting time of day	8.00-17.00(96.40%); 10:00-14:00(2.40%) 09:00-13:00(1.20%)
Extracting honey	Harvesting method	Shake and brush (100.0%), Extraction devices
		Electric honey extractor (45.24%), Manual honey extractor (54.76%)

**Table 2.** The statics of on annual honey, pollen, beeswax, and propolis production in beekeeping enterprises.

Bee product	Honey		Pollen		Beeswax		Propolis	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Number of enterprises	84		24		13		6	
Ratio of enterprise	100.00		28.57		15.48		7.14	
Enterprise capacity (hives)	323.98	18.56	315.04	35.04	294.31	42.15	195.83	41.97
Ratio of beehives (%)	67.70	2.57	72.05	4.27	68.69	6.28	67.40	8.73
Number of beehives	220.17	15.49	212.87	30.76	240.62	38.80	129.67	20.77
Production (kg/year)	3169.93	78.72	331.58	99.21	115.77	20.16	2.91	0.66
Yield (kg/colony/year)	14.28	0.64	1.26	0.28	0.51	0.09	0.02	0.00
Honey season (days/year)	258.04	14.48	125.21	27.23	183.85	40.39	150.83	50.30
Number of apiary locations	3.13	0.16	2.42	0.37	3.08	0.56	2.67	0.95

**Table 3.** The results on bee transport, insurance, marketing, and honey quality monitoring in the beekeeping enterprises.

Factors	Variables	Results
Transporting hives	Enterprise's own transport vehicle	Yes (35.71%), No (64.29%)
	Type of own transport vehicle	Truck (1.19%), pickup (22.62%), tractor (11.90%)
	Beehive transport with a rental car	All vehicles were rental (64.29%) Both of own and rental vehicles (4.76%) All vehicles belonged to the enterprise (30.95%)
	Type of rental transport vehicles	Truck (69.05%)
	Number of hives transported per truck	400.82±0.75
	Number of hives transported per pick-up	119.09 ±11.19
	Number of hives transported per tractor	136.40±2.35
Driver	Drivers of transport vehicles	Beekeepers (100.0%)
Vehicle's speed	Average speed by road type	Asphalt:87.56±0.49
	(kilometers/hours)	Stabilized: 32.74±0.59
Travel vehicles for beekeepers	Enterprise's travel vehicle	Yes (%77.38) No (22.62%)
	Number of travel vehicle	One car (73.81%), 2 cars (3.57%)
	Type of travel vehicle	Motorcycle (11.91%), Minibus (10.71%) Automobile (54.76%),
Fuel expense	Annual fuel usage (liter)	1280.36±94.04
	Annual distance (km)	5533.21±569.02
Insurance	Vehicle insurance	No (100.0%)
	Beehive insurance	No (100.0%)
Producer prices	Honey (TL)	30.56± 8.70
	Pollen (TL)	48.96±5.75
	Beewax (TL)	303.64±83.62
Marketing	Marketing channel of bee products	Beekeeper to consumer (63.10%)
		Beekeeper to a wholesaler (21.43%)
		Both beekeeper and wholesalers (15.47%)
		Wholesaler companies
	Wholesaler companies in İstanbul (19.05%)	
Wholesaler companies in Muğla (10.71%)		
Wholesaler companies in İzmir (3.57%)		
Wholesaler companies in Aydın (3.57%)		
Quality monitoring	Ingredients/residue tests in honey	Institutes that carry out the tests
		Wholesaler companies laboratories (2.38%)
		Private laboratories (2.38%)
		laboratories Public institution (2.38%)
University laboratories (3.57%)		

**Table 4.** The results related to the traits of beehives and apiary lands, bee diseases, and the data recording and colony losses.

Factors	Variables	Results
Beehives	Type of hives	Longstroth hives with single honey super (100.00%)
	Materials of hives	Wooden (97.62%) Plastic (2.38%)
	Cleanness of hives	Clean (75.00%), slightly dirty (23.80%), very dirty (1.20%)
	Quality of hives	Solid (54.80%), slightly worn (9.50%), very worn (35.70%)
Beehives are arranged in a long line	Outer cover	Appropriate (100.0%)
	Height of hive stand from the ground (cm)	11.13±0.71
Beehive placement	Distance between the beehive rows (m)	5.30±0.22
	Distance between the beehives on a row (cm)	19.56 ±1.61
Beekeeping equipment	Cleannes of equipments	Clean (100.0%)
	Quality of equipments	Solid (60.70%), slightly worn (38.11%), very worn (1.19%)
Apiary land	Ownership of apiary	Private land (45.20%) Village land (32.20%) Land owned by other legal entities (22.60%)
	Apiary land assessment	adequate(94.00%), inadequate (6.00%)
	Nectar and pollen plants in the apiaries	Wild flowe (23.80%), Fruit trees (4.80%), Shrubs (8.30%), Wild flowe+ Fruit trees (4.80%), wild flower+ Shrubs (4.80%), wild flower+ Fruit trees + Shrubs (53.50%)
Bee health	Bee diseases	Occurred (45.24%), Not occurred (54.76%)
	Bee diseases	Nosema (38.10%) Chalkbrood disease (2.38%), American foulbrood disease (2.38%), Unrecognized disease (2.38%)
	Bee pests	Occurred (92.86%), not Occurred (7.14%)
	Bee pests	Varroa (92.86%), Bee-eater (9.52%) Wasp (3.57%), Ant (2.38%) Bear (2.38%), Hedgehog (1.19%)
Struggling with diseases	Bee health protection measures	Applying (100.0%)
	Post-harvest pesticide control	Both for Varroa and Nosema (28.57%) For Varroa (45.23%), for Nosema (4.76%) For Lime Disease (1.19%) Only cleaning/disinfection (7.14%)
Losses	Hives and colonies	Yes (11.90%), No (88.10%)
	Disposal methods of infected hives and colonies	By burning (2.38%), by burying (9.52%)
	Eradication methods	Cleaning +disinfection (10.71%) Burning and scraping (51.19%) Burning + scraping + bleach (28.58%) Incineration + cleaning with water (4.76%) Burning + scraping + thyme or pollen solution (4.76%)
Recording data	Recording enterprises's data	Yes (51.19), No (%48.81)
	Records kept	Production + bee diseases + treatment (28.58%) Bee diseases + treatment (10.71%) Production (11.90%)

for North East Anatolian Region (Sezgin and Kara, 2011). The variation between these reports may be due to several environmental factors affecting honey production. It is seen that one of them was enterprise capacity. Indeed, this study has determined that the more sizes of the bee enterprises increase, the more honey yield per hive increases, and that honey yield reached 16.89 kg/hive in enterprises with >451 hives. These findings showed that medium and large-scale enterprises were more effective in beekeeping (Figure 1) and have more nectar and pollen flow by staying longer time at different apiaries (Özbakır et al., 2016; Öztürk, 2013). Uzundumlu et al. (2011) reported similar findings in Bingöl, but Üçeş and Erişir (2016) reported that small-scale enterprises businesses were more common in Erzincan. These results were also consistent with the importance of good queen bee and colony management. Because beekeepers reported that they raised the queen themselves (84.52%), changed the queen at most two-year-long periods (96.4%), and made hive checks on average six times a month. Previously, it reported that strong colonies with young and healthy queens and good bee care and optimum feeding practices for the winter, spring, and summer seasons support honey production and other honey products (Doğaroğlu, 2009; Şeker et al., 2017).

In 28.57, 15.48, and 7.14% of beekeeping enterprises, the beekeepers reported production as 1.26 kg of pollen, 0.51 kg of beeswax, and 0.02 kg of propolis per hive, respectively. The results obtained in terms of honey and pollen production per hive were in line with the reports of Alataş et al. (1997) (Honey is 35-44 kg/hive, and dry pollen is 1.56 kg/hive). It is determined that 63.10% of the enterprises sold honey by retail and 21.43% through wholesalers, the average honey price calculated as 30.56 TL/kg. This value was lower than TURKSTAT 's suggested honey retail price (46.45 TL/kg) in December 2020 (Anonymous, 2021). According to the marketing results realized in the enterprises, it is determined that the average prices of pollen and beeswax were 48.96 and 303.64 TL. In addition, only 10.71% of beekeepers reported that they purchased testing services for residue and quality control in honey (Anonymous, 2021).

It has revealed that two-thirds of the enterprises transported beehives via transport vehicles (trucks, trucks, pick-up trucks, or tractors) used for general purposes in the transport sector; only the remaining one-third have their transport vehicles. Accordingly, it is understood that these transport vehicles do not have the particular

standards required to protect bee health and welfare during transport. These findings suggested that both beehives could be damaged during transport, and bee health and welfare could be adversely affected. In enterprises, it is determined that all of the beehive transport vehicles were driven by the beekeepers, and the average vehicle speed was determined to be 87.56 km/h on the asphalt roads and 32.74 km/h on the stabilized roads. The fact that only 77.38% of the enterprises have travel cars (mainly automobiles) points to other difficulties related to travel and an accommodation that beekeepers face. Beekeepers have traveled an average of 5533.21 km (3 to 7 apiary areas) annually with these vehicles but did not have vehicle or hive insurance. These results could be attributed to financial problems in bee enterprises. Contrary to the statement of Onuç et al. (2019) for beekeepers in İzmir, 69.0% of beekeepers benefited from loan support for business financing, and only 22.60% of those benefited from beekeeping grant support.

Half of the beekeepers reported colony losses due to bee diseases and, almost all of them for Varroa. It was understood that the bee population in a hive before winter was 42321.43 on average and bee losses were high in the winter season. Results were parallel to other reports (Karahana et al., 2019; Özbakır et al., 2016; Şeker et al., 2017). Moreover, 12% of the enterprises' infected honey, hives, and colonies were destroyed and caused economic losses. Although beekeepers carried out cleaning, disinfection, and medical applications in their hives after harvesting, it is thought that bee losses were high. This contradictory result suggested that success in bee health protection and disease control in enterprises was still insufficient. Only 28.58% of the enterprises keep regular records on production, bee diseases, and treatments. In addition, the presence of dirty and warned-out hives also supported this result. It was observed that surveyed apiaries mainly belonged to actual persons and villagers (77.40%). It also observed that there was no emergency plan for natural disasters in any apiaries.

Consequently, it has been concluded that honey yield increased with the enterprise size, the hives were dense in the apiary land, the amount of dirty and worn hives were high, and the preventive measures against natural disasters were insufficient in migratory beekeeping enterprises. Also, it was understood that beekeepers have difficulties obtaining apiary land and in bee product marketing, and they cannot cope with bee diseases despite their protective practices such as disinfection.

## Acknowledgments

We are thankful to the Afyon Kocatepe University Scientific Research Projects Coordination Unit for the financial support to this research (Project number 19.SAĞ.BİL.12).

## References

- Akyol E, Yeninar H, Kaftanoğlu O, Özkök D, 2003: Bazı saf ve melez bal arısı genotiplerinin (apis mellifera l.) farklı mevsimlerdeki hırçınlık davranışlarının belirlenmesi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 3 (3), 38-40.
- Alataş Yalçın Lİ, Öztürk Aİ, 1997: Arıcılıkta Polen üretiminin koloni gelişimine ve bal verimine etkileri. *Anadolu Journal of AARI*, 7 (1),30-42.
- Anonymous 2020: Afyon Tarımsal Yatırım Rehberi. Tarım ve Orman Bakanlığı Strateji Geliştirme Başkanlığı Proje ve Yatırım Yönetimi Daire Başkanlığı Tarımsal Yatırımcı Danışma Ofisi. Mayıs 2020. [https://www.tarimormann.gov.tr/SGB/TARYAT/Belgeler/il\\_yatirim\\_rehberleri/afyonkarahisar.pdf](https://www.tarimormann.gov.tr/SGB/TARYAT/Belgeler/il_yatirim_rehberleri/afyonkarahisar.pdf), Erişim tarihi; 19.07.2020.
- Anonymous, 2021: Ürün Raporu ARICILIK 2021.Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, Ankara. TEPGE Yayın No:330, ISBN: 978-605-7599-63-6.
- Anonymous 2021a. Ege Bölgesi Hatırası. Coğrafya Dünyası <https://www.cografya.gen.tr/egitim/bolgeler/ege.htm>, Erişim tarihi: 28.09.2021.
- Bozkurt Z, 2019: Bal arılarında refah. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 8 (2),96-108.
- Doğaroğlu M, 2009: Modern Arıcılık Teknikleri. 4. Basım, Doğa Arıcılık San. Tic. Ltd. Şti. Tekirdağ.
- Forfert N, Natsopoulou ME, Frey E, Rosenkranz P, Paxton R J, Moritz R F, 2015: Parasites and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera*) and their influence on inter-colonial transmission. *PLoS one*, 10 (10), e0140337.
- GEKA 2019: Arıcılık Ürünleri Sektör Analizi 2019: Güney Ege Kalkınma Ajansı. [https://geka.gov.tr/uploads/pages\\_v/guney-ege-bolgesi-aricilik-urunleri-sektor-raporu.pdf](https://geka.gov.tr/uploads/pages_v/guney-ege-bolgesi-aricilik-urunleri-sektor-raporu.pdf), Erişim tarihi: 22.07.2020.
- Karaca N, Özince G, 2019: Serhat Kalkınma Ajansı. Ardahan Arıcılık Sektörü Mevcut Durum Analizi ve Stratejik Eylem Planı, Kars.
- Karahan A, Acar İ, Karaca R, Özşahin İ, 2019: Afyonkarahisar ili arıcılık faaliyetleri. II. Uluslararası Tarım Kongresi /2nd International Agricultural Congress, 21-24 Kasım / November 2119.
- Onbaşlı D, Yuvalı Çelik G, Kahraman S, Kanbur M, 2019: Apiterapi ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Erciyes Univ Vet Fak Derg*,16 (1), 49-56.

- Onuç Z, Yanar A, Saner G, Güler D, 2019: An Analysis on Economical Aspect of the Beekeeping Enterprise: A Case of Kemalpaşa District-Izmir/Turkey, *Ege Univ. Ziraat Fak. Derg*, 56 (1),7-14.
- Özbakır GÖ, Doğan Z, Öztokmak A, 2016: Adıyaman İli arıcılık faaliyetlerinin incelenmesi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 20 (2), 119- 126.
- Özbilgin N, Alataş İ, Balkan C, Öztürk Aİ, Karaca Ü, 1999: Ege Bölgesi arıcılık faaliyetlerinin teknik ve ekonomik başlıca karakteristiklerinin belirlenmesi. *Anadolu*, 9 (1),149-170.
- Öztürk FG, 2013: Ordu ili Arıcılık Sektörünün Ekonomik Yapısı Üzerine bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Öztürk Aİ, 2017: Muğla İli Ula ilçesi arıcılığının bazı teknik özelliklerinin belirlenmesi. *Hayvansal Üretim*, 58 (2), 52-57.
- Paksoy M, Bulut OD, Türkmen B, 2016: Muğla ilinde arıcılık işletmelerinin sosyo ekonomik yapısı. 5.Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi, 1-5 Kasım 2016 Fethiye. Dijital Bildiri Özetleri Kitabı, s:202.
- Sekaran U, 2003: Research Methods for Business. John Wiley High Education yayınları. New York.
- Sezgin A, Kara M, 2011: Arıcılıkta verim artışı üzerinde etkili olan faktörlerin belirlenmesine yönelik bir araştırma: TRA2 bölgesi örneği. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*,15, 31-38.
- Şahingöz SA, İnci F. 2018: Bolu ilinde üretilen arı ürünlerinin gastronomi turizmi kapsamında değerlendirilmesi. *Güncel Turizm Araştırmaları Dergisi*, 2(Ek-1), 519-533.
- Şeker İ, Köseman A, Karlıdağ S, Aygen S, 2017: Arıcılık faaliyetleri II: Malatya ilinde arıcılık faaliyetlerinin yetiştirici tercihleri, üretim nitelikleri ve arı hastalıkları kapsamında değerlendirilmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14 (02), 54-63.
- Topal E, Özsoy N, Şahinler N, 2016: Küresel Isınma ve Arıcılığın Geleceği. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21 (1):112-120.
- Ural A, Kılıç İ, 2013: Bilimsel Araştırma Süreci ve SPSS ile Veri Analizi.Detay Yayıncılık.4. Baskı, Ankara.
- Uzundumlu A, Aksoy A, Işık HB, 2011: Arıcılık işletmelerinde mevcut yapı ve temel sorunlar; Bingöl ili örneği. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 42 (1), 49-55.
- Üçeş E, Erişir Z, 2016: Erzincan ili arıcılığının sosyo-ekonomik yapısı. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 30(1), 33-38

\*Correspondence: Zehra Bozkurt

Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Husbandry, Afyonkarahisar, Turkey.

e-mail: zhra.bozkurt@gmail.com,



## Comparison of Anesthetic Efficacy of Intranasal Administration of Medetomidine / Ketamine and Diazepam / Ketamine Combinations on New Zealand White Rabbits

Zeynep BOZKAN<sup>1,a,\*</sup>, Rahime YAYGINGUL<sup>1,b</sup>, Osman BULUT<sup>2,c</sup>

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Aydın/TURKEY

<sup>2</sup>Muğla Sıtkı Koçman University, Milas Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Muğla/TURKEY

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-4233-6496, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0001-7402-9031, <sup>c</sup>ORCID: 0000-0003-2773-8243, <sup>d</sup>ORCID: , <sup>e</sup>ORCID:

Geliş Tarihi: 13.08.2021

Kabul Tarihi: 01.11.2021

**Abstract:** This study aimed to determine the anesthetic efficacy of intranasal medetomidine/ketamine and diazepam/ketamine combinations in New Zealand White rabbits. For this purpose, 12 adult New Zealand White rabbits weighing 2.3-4.1 kg were used by randomly dividing the animals into two groups of six animals: Medetomidine - Ketamine (MK) and Diazepam - Ketamine (DK). Intranasally, medetomidine (0.2 mg kg<sup>-1</sup>) and ketamine (10 mg kg<sup>-1</sup>) combination was administered to the MK group and, diazepam (1 mg kg<sup>-1</sup>) and ketamine (10 mg kg<sup>-1</sup>) to the DK group. Before and 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, and 60 minutes after anesthesia, loss, and recovery of the reflexes were evaluated. Onset and duration of the anesthesia, duration of the surgical anesthesia, and the total anesthesia time were also recorded. Loss and recovery time of reflexes was shorter in the DK group compared to the MK group. Respiratory rate, heart rate, and SpO<sub>2</sub> decreased as expected in both groups but all parameters, especially SpO<sub>2</sub>, were lower in the MK group comparing the DK group. These results showed that both MK and DK combinations administered IN provide anesthesia in the time and depth that minor surgical procedures and clinical applications could be performed. Although it seems promising considering its practicality and anesthetic efficacy, it is clear that more detailed studies with more animals are needed before the safety of these protocols can be established. Their use, recommended for routine clinical procedures when considered SpO<sub>2</sub>, was severely decreased, especially in the MK group.

**Keywords:** Anesthesia, Intranasal, Ketamine, Rabbit, Sedation.

### Yeni Zelanda Beyaz Tavşanlarında Medetomidin / Ketamin ve Diazepam / Ketamin Kombinasyonlarının İntranazal Uygulamasının Anestezik Etkinliğinin Karşılaştırılması

**Özet:** Bu çalışmada Yeni Zelanda Beyaz tavşanlarında intranazal medetomidin/ketamin ve diazepam/ketamin kombinasyonlarının anestezik etkinliğini belirlemek amaçlandı. Bu amaçla, 2,3-4,1 kg ağırlığında 12 adet yetişkin Yeni Zelanda Beyaz tavşanı Medetomidin - Ketamin (MK) ve Diazepam - Ketamin (DK) olmak üzere rastgele 6'şarlı iki gruba ayrılarak kullanıldı. İntranazal olarak, MK grubuna medetomidin (0,2 mg kg<sup>-1</sup>) ve ketamin (10 mg kg<sup>-1</sup>), DK grubuna diazepam (1 mg kg<sup>-1</sup>) ve ketamin (10 mg kg<sup>-1</sup>) kombinasyonu uygulandı. Anestezi öncesi ve anesteziden 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 ve 60 dakika sonra reflekslerin kaybı ve geri kazanımı değerlendirildi. Anestezi başlangıcı ve süresi, cerrahi anestezi süresi ve toplam anestezi süresi de kaydedildi. DK grubunda refleks kaybı ve geri kazanım süresi MK grubuna göre daha kısaydı. Solunum hızı, kalp hızı ve SpO<sub>2</sub> her iki grupta da beklendiği gibi azaldı ancak MK grubunda DK grubuna göre başta SpO<sub>2</sub> olmak üzere tüm parametreler daha düşüktü. Bu sonuçlar, intranazal uygulanan hem MK hem de DK kombinasyonlarının, küçük cerrahi işlemlerin ve klinik uygulamaların yapılabileceği zaman ve derinlikte anestezi sağladığını göstermiştir. Pratikliği ve anestezik etkinliği göz önüne alındığında sonuçlar umut verici görünse de, özellikle MK grubunda SpO<sub>2</sub>'nin ciddi şekilde azaldığı düşünüldüğünde bu protokollerin güvenliğinin oluşturulabilmesi ve rutin klinik prosedürler için kullanımlarının önerilebilmesi için daha fazla hayvanla daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Anestezi, İntranazal, Ketamin, Sedasyon, Tavşan.

## Introduction

Rabbits are widely considered companion animals as well as laboratory animals. During the applications that may cause pain or stress for diagnosis, treatment, or any research, the administration of anesthesia is essential to the animal's welfare (Carlsson et al., 2004; Weiland et al., 2017). Generally, anesthesia provides unconsciousness, stress, and pain management during diagnostic-therapeutic interventions such as

radiography, wound care, endoscopy (Vesal and Zare, 2006).

Because rabbits are one of the most common animal species on which anesthetic applications are performed, it is vital to define safe anesthesia protocols (Brodbeck, 2009; Claire et al., 2005). Choosing the anesthetic technique varies depending on the species of the animal, the type and duration of the procedure, the experience of

the researcher, and the purpose of the experiment (Kohn and Martin, 2007). However, intramuscular or intravenous injections and inhalation are the most commonly used methods (Moghadam et al., 2009).

Injectable anesthetics have advantages such as low cost and fast induction, and minimal equipment needs and, can be applied by intramuscular (IM), subcutaneous (SC), intravenous (IV), or intranasal (IN) routes (Vesal and Eskandari, 2006). In rabbits, IV administration is the most commonly used induction and maintenance anesthesia method, but it can be difficult to implement, and complications such as respiratory arrest may occur. On the other hand, IN application is a helpful and straightforward method that enables the drug to reach the central system directly by the olfactory and trigeminal nerves; therefore, it acts as fast as IV administration. It also does not cause pain in the application area as much as intramuscular injections (Santangelo et al., 2016a; Santangelo et al., 2016b). Due to the indication for the use of diazepam in treating of acute seizures, studies are carried out on the nasal route in terms of its practicality (Li et al., 2000; Kaur et al., 2008). There are also limited studies of intranasal administration of various ketamine combinations in rabbits. (Canpolat et al., 2016; Weiland et al., 2017). This study aimed to compare the onset, duration and recovery of anesthesia following IN administration of medetomidine–ketamine or diazepam–ketamine in New Zealand White rabbits. Intranasal administration of these combinations, it was possible to provide anesthesia in the time and depth that minor surgical procedures and clinical applications could be performed.

## Materials and methods

This study was approved by Aydin Adnan Menderes University Animal Experiments Local Ethics Committee (on 23/10/2018 and numbered 2018/116). Good practices for animal experimentation conducted all the procedures.

**Animals:** The study material constituted of 9-10 months old, 12 adult New Zealand White rabbits (six male, six female) weighing 2.3-4.1 kg. The rabbits were obtained from a commercial experimental animal breeding laboratory (SYLAB). The animals were housed in individual cages (70x70x45 cm) for two weeks, acclimation to environmental conditions before starting the experiment. They have maintained a 12:12 hours light-dark cycle (lights on at 06.00 hours) in a controlled housing room, temperature 16-19 °C and humidity 50-60% conditions. Animals were fed a

commercial pelleted diet and tap water *ad libitum*.

**Study Design:** At the end of the acclimation period, general clinical examinations of the animals were performed, and those without any health problems were included in the trial. Each cage was given a number. On the experiment day, the animals were assigned into two groups of six by randomly choosing a number (using a random number generator). Medetomidine (0.2 mg kg<sup>-1</sup>; Domitor®; Zoetis, Turkey) and ketamine (10 mg kg<sup>-1</sup>; Ketazol® 10%; Interhas, Turkey) were administered to group MK, and diazepam (1.0 mg kg<sup>-1</sup>; Diazem®; DEVA, Turkey) and ketamine (10 mg kg<sup>-1</sup>) were administered to group DK.

Anesthetic agents were diluted to 0.4 ml kg<sup>-1</sup> with saline and administered using an injector attached to a 24 G IV catheter without a stylet. Rabbits were restrained by wrapping a towel in a sternal position and the head and neck gently dorsoflexed by an assistant for IN instillation. Anesthetic dilution was administered by inserting the catheter through the nostril up to 1/4 of its length (approximately 4-5 mm).

Different investigators prepared and administered the anesthetic agent to the rabbits from the ones following reflexes during anesthesia. Reflexes such as postural reflex, pinnal (ear pinch) reflex, anterior pedal withdrawal reflex, posterior pedal withdrawal reflex, and pupillary light reflex were scored before and 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, and 60 minutes after anesthesia by the same investigator. A hemostatic forceps was used for pinch in all rabbits, and reflexes were classified as absent or present. The time elapsed between the loss of standing reflex and return of the standing ability for 60 seconds was recorded as the duration of the anesthesia. The time interval between the loss and return of pinnal and pedal reflexes was noted as the duration of the surgical anesthesia. The time between anesthetic agent administration and the return of all reflexes was evaluated as the total anesthesia time.

**Statistical analysis:** SPSS 14.01 package program (Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis of the data obtained at the end of the study. Shapiro-Wilk and Levene tests were used to evaluate the data, ensure the normal distribution and homogeneity of the variances, and perform measurements. The Independent Sample t-test analyzed reflexes because the assumptions were met. The Variance Analysis method was preferred for repeated measurements such as respiration rate, heart rate, body temperature, and SpO<sub>2</sub>. For all statistical decisions, P <0.05 criterion was used as the level of significance.

## Results

Between the DK and MK groups; The time to loss of all reflexes such as postural reflex, pinnal reflex, tail reflex, anterior pedal reflex, posterior pedal reflex, and pupillary reflex was shorter in the DK group than MK group (Table 1, Figure 1). The mean time of onset of anesthesia was  $2.1 \pm 0.2$  minutes in the DK group, but it was  $6.4 \pm 1.4$  minutes in the MK group. Also, the means of recovery time of all reflexes and duration of anesthesia (second) were more extended ( $66 \pm 4.3$  minutes) in the MK group than in the DK group ( $33.5 \pm 1.6$  minutes) (Table 1).

The respiratory rate decreased at the 5th, 10th, 15th, 20th, 25th, 30th, 45th, and 60th minutes

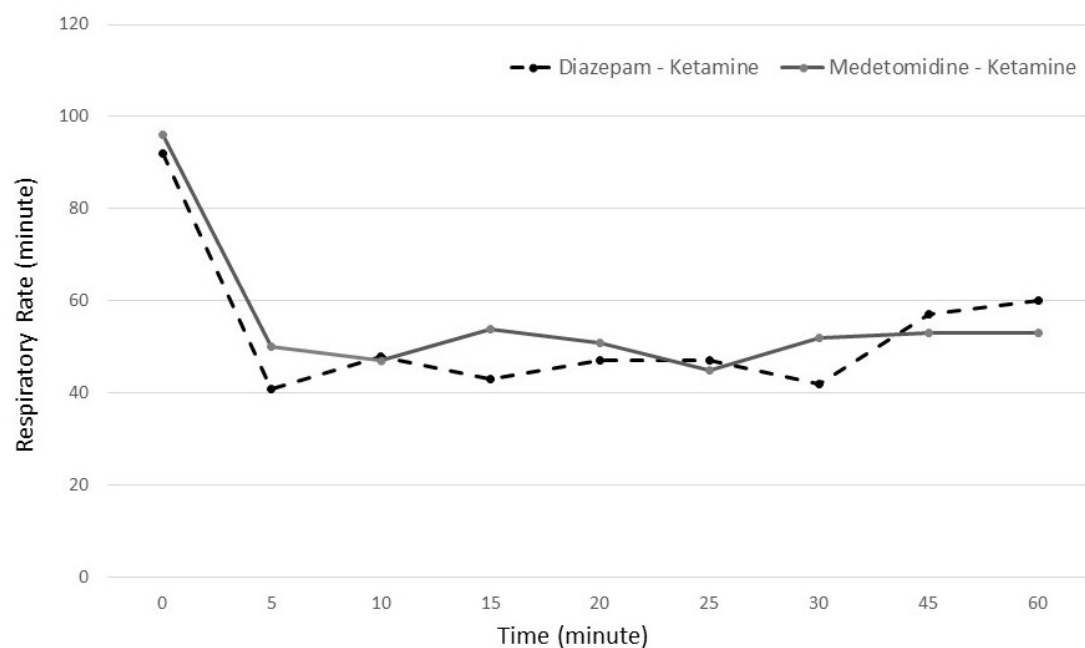
compared to the 0th minute in both groups in terms of the time factor. There was no difference in respiratory rate between DK and MK groups (Figure 1).

Heart rates decreased at the 45th and 60th minutes in both groups compared to the 0th minutes. However, the MK group revealed lower heart rates than the DK group ( $p=0.003$ ) (Figure 2).

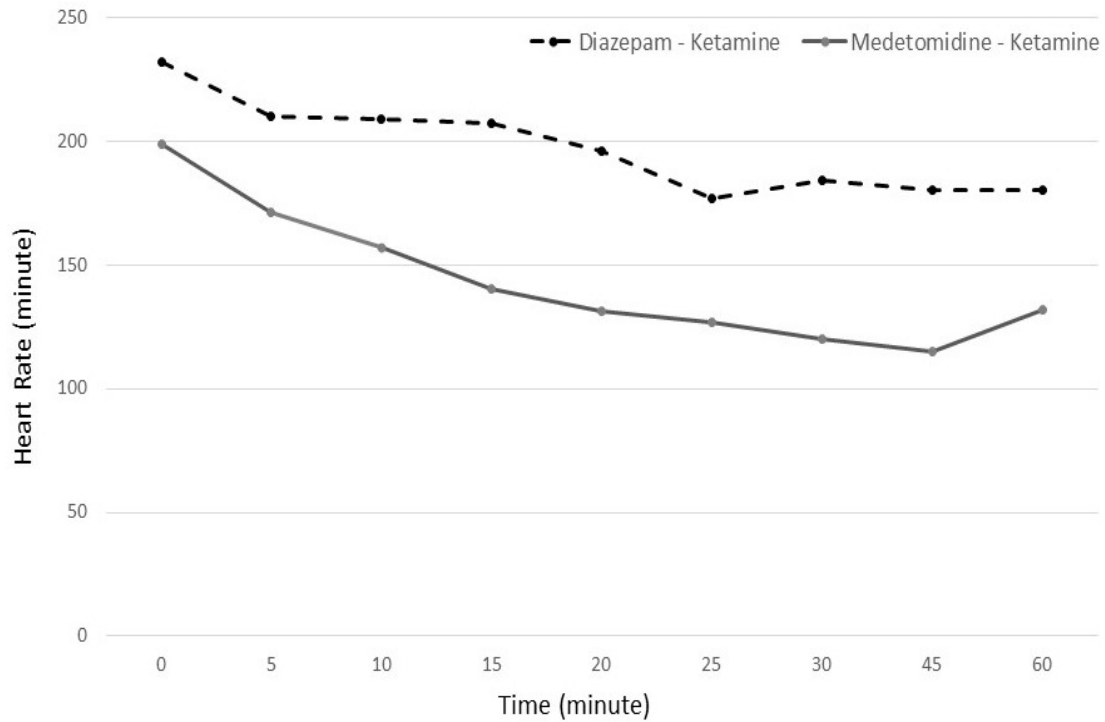
There was no significant difference in body temperature in terms of group and time (Figure 3). However, SpO<sub>2</sub> was decreased at the 15th, 20th and 25th minutes compared to the 0th minute in the MK group ( $p = 0.010$ ,  $p = 0.017$ ,  $p = 0.015$ ). Also, the MK group revealed lower values which indicates hypoxemia comparing the DK group ( $p=0.019$ ) (Figure 4).

**Table 1.** Differences between the Diazepam-Ketamine (DK) group and Medetomidine-Ketamine (MK) groups in terms of loss and recovery of all reflexes and duration of anesthesia in the rabbits (n=6). Data are minutes presented as mean  $\pm$  standard deviation.

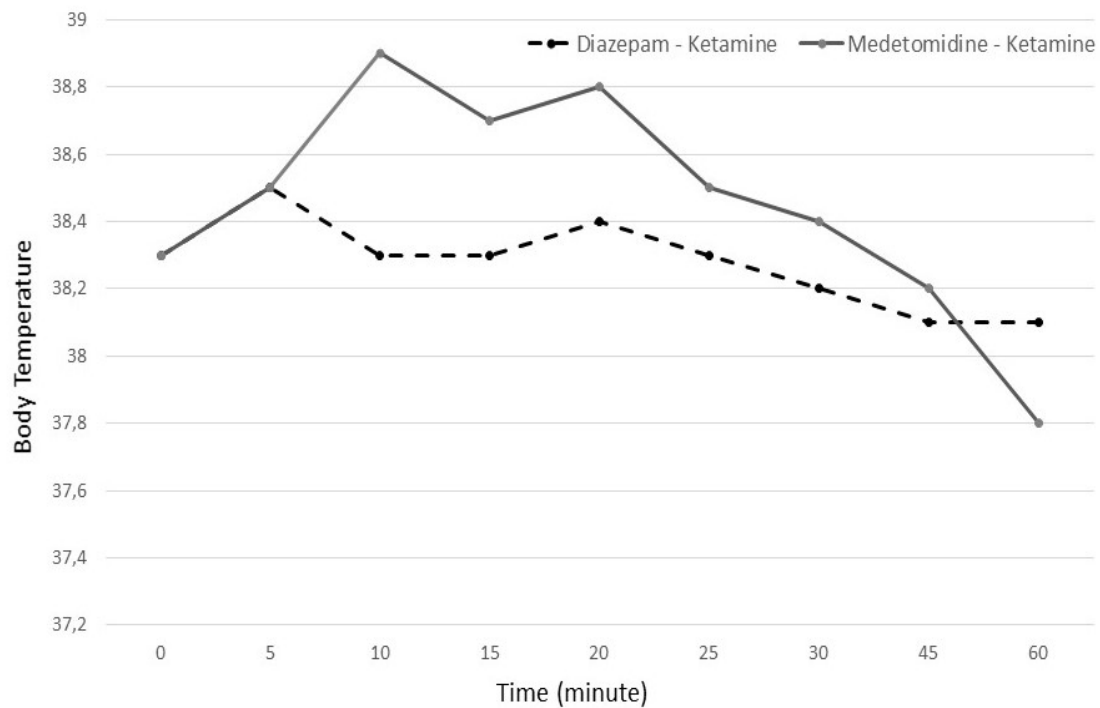
Group	Reflexes						Recovery of all Reflexes	Duration of Anesthesia
	Postural	Pinnal	Tail	Anterior Pedal	Posterior Pedal	Pupillary		
D/K	$1.1 \pm 0.2$	$2 \pm 0.1$	$1 \pm 0.1$	$2.2 \pm 0.2$	$2.1 \pm 0.2$	$2.1 \pm 0.2$	$33.5 \pm 1.6$	$33.5 \pm 1.6$
M/K	$3.9 \pm 0.7$	$6.4 \pm 1.4$	$6.6 \pm 1.3$	$6.6 \pm 1.3$	$6.4 \pm 1.4$	$6.4 \pm 1.4$	$66 \pm 4.3$	$66 \pm 4.3$
<i>p</i>	<b>0.003</b>	<b>0.01</b>	<b>0.007</b>	<b>0.009</b>	<b>0.013</b>	<b>0.013</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>



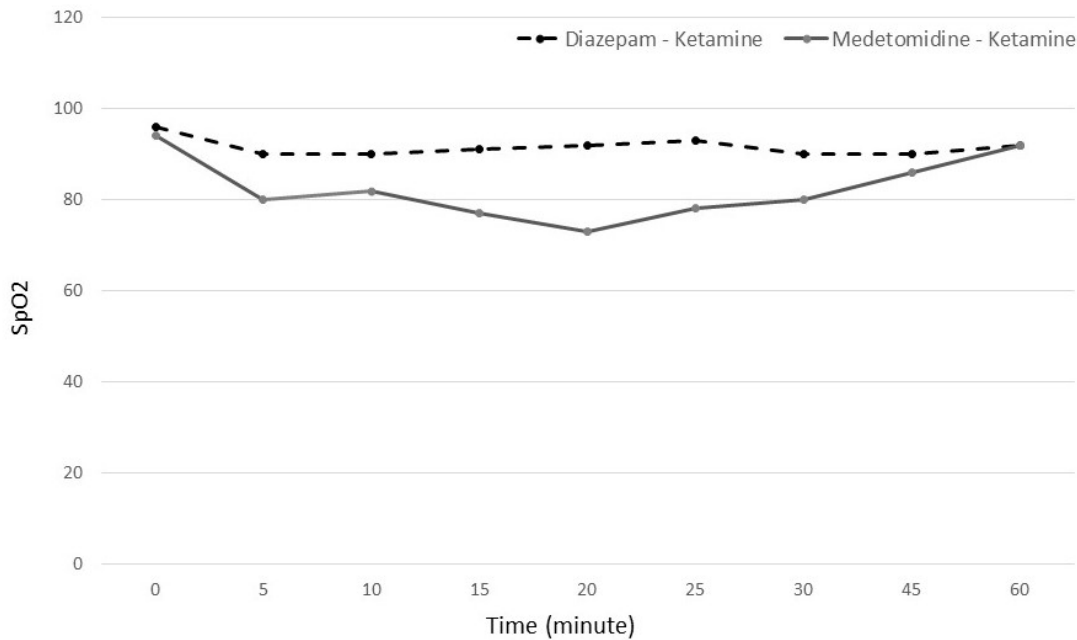
**Figure 1.** The changes in respiratory rate in terms of time factor ( $p < 0.005$  at the 5th, 10th, 15th, 20th, 25th, 30<sup>th</sup> minutes and  $p < 0.05$  at 45<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> minutes comparing the 0th minute).



**Figure 2.** The changes in heart rate in terms of time factor ( $p < 0.05$  at 45<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> minutes comparing the 0<sup>th</sup> minute) and that the heart rates of the DK group were higher than the MK group ( $p = 0.003$ ).



**Figure 3.** The changes in body temperature. No significant difference was seen between groups and in terms of time factor.



**Figure 4.** The changes in SpO<sub>2</sub> in terms of group and time. SpO<sub>2</sub> decreased in MK group at the 15<sup>th</sup> ( $p = 0.010$ ), 20<sup>th</sup> ( $p = 0.017$ ) and 25<sup>th</sup> ( $p = 0.015$ ) minutes compared to the 0<sup>th</sup> minute.

## Discussion and Conclusion

Rabbits are cited as the third most common animal species that take anesthesia for medical and scientific reasons. However, more deaths caused by anesthesia are reported than in dogs and cats (1.39%) (Brodbeil, 2009). Thus, it is essential to constitute anesthetic methods and protocols that do not affect the study results and cause physiological changes or permanent damage in rabbits (Claire et al., 2005). In the presented study, all rabbits recovered from anesthesia without any problems.

Today, the most preferred anesthetics are those applied by injection and inhalation (Moghadam et al., 2009). Low cost, fast anesthesia induction, and minimal equipment requirement than to inhalation anesthesia give prominence to injectable anesthesia in practical use (Vesal and Eskandari, 2006). On the other hand, disadvantages include the inability to provide sufficient depth of anesthesia and unintentionally prolonged anesthesia duration (Rozanska, 2009). It was effortless to administer anesthesia by intranasal route during the study. Rabbits easily tolerated the procedure.

Intramuscular medetomidine - ketamine anesthesia in rabbits gives very successful results (Henke et al., 2005). Medetomidine increases the degree of visceral anesthesia and provides comfortable waking for the animal. Therefore, it

is often used with ketamine (Okumuş, 2003). Complications such as hypotension, bradycardia, respiratory depression, diuresis and, glycosuria are known to occur with additional doses (Rozanska et al., 2009). The combination of diazepam and ketamine is reported to cause minimal cardiovascular and respiratory depression besides excellent muscle relaxant effects (Gil et al., 2004). The anesthesia protocols used in the study caused an expected decrease in respiratory frequency, heart frequency, and body temperature. The decrease in SpO<sub>2</sub> indicated significant hypoxemia in the MK group.

Intravenous administration of additional doses required to maintain anesthesia in rabbits causes problems such as respiratory arrest (Santangelo et al., 2016a; Santangelo et al. 2016b; Weiland et al. 2017). Intranasal administration acts as quickly as IV administration. In addition, it is a helpful and straightforward method that does not cause pain where it is performed like intramuscular applications (Santangelo et al., 2016a; Santangelo et al. 2016b). Intranasal administration of anesthetic agents alone or in combination was previously reported in rabbits (Vesal and Zare, 2006). The administration method, drug amount, and animal's position affect the absorption of the drug (Weiland et al., 2017). Both groups in this study provided a depth and duration of anesthesia in which minor surgical procedures can be performed without the need for an additional dose.

This result indicated that the drug dose, route of administration, and position were chosen appropriately for the procedure.

In a study that investigated the plasma pharmacokinetics and brain uptake of diazepam in New Zealand white rabbits after intravenous (1 mg kg<sup>-1</sup>) and intranasal administration (2 mg kg<sup>-1</sup>), it was found that diazepam was rapidly absorbed into the systemic circulation and showed readily and nearly homogeneous distribution into the brain tissues following IN and IV administration in rabbits (Kaur and Kim, 2008). In another study performed on rabbits, intranasal diazepam (1 mg kg<sup>-1</sup>), The peak plasma concentrations were observed within 2–3 min and it was concluded that the anticonvulsants might be promptly and timely delivered to patients in need of emergency treatment for status, through the IN application (Li et al., 2000). In the presented study, the dose range of IN diazepam was accepted as 1-2 mg kg<sup>-1</sup> based on previous studies, and it was used as 1 mg/kg since it would be combined with ketamine.

In a study compares that the efficacy and side effects of induction with medetomidine (0.2 mg kg<sup>-1</sup>) ketamine (10 mg kg<sup>-1</sup>) or medetomidine S(+)-ketamine (5 mg kg<sup>-1</sup>) by intranasal (IN) instillation in rabbits, no significant differences were reported between treatments and both procedures allowed for endotracheal intubation shortly after IN delivery (Weiland et al., 2000). Another study where ketamine was administered intranasally in combination with morphine and dexmedetomidine in rabbits reported that deep sedation was successfully provided for 20 minutes (Canpolat et al., 2016). In the presented study, successful anesthesia was induced using the combination of 10 mg kg<sup>-1</sup> ketamine with 0.2 mg kg<sup>-1</sup> medetomidine.

These results showed that both MK and DK combinations administered IN provide anesthesia in the time and depth that minor surgical procedures and clinical applications could be performed. However, the onset and duration of the anesthesia were shorter in the DK group than in the MK group, and the decrease in respiratory rate, heart rate, and SpO<sub>2</sub> was lower in the DK group. Although no vital complications were encountered in the presented study, SpO<sub>2</sub> was severely decreased, especially in the MK group. This study has limitations, such as blood gases analysis could not be performed and has a small number of animals. Therefore, it is clear that more detailed studies with more animals are needed before routine clinical use. However, it seems promising considering its practicality and anesthetic efficacy.

## References

- Bechgaard E, Gizurarson S, Hjortkjaer RK, 1997: Pharmacokinetic and pharmacodynamic response after intranasal administration of diazepam to rabbits. *J Pharm Pharmacol*, 49, 747–750.
- Brodbeck DC, 2009: Perioperative mortality in small animal anesthesia. *Vet J*, 182, 152-161.
- Canpolat I, Karabulut E, & Cakir S, 2016: The efficacy of intranasal administration of dexmedetomidine, ketamine and morphine combination to rabbit. *Int J Dev Res*, 6(7), 8634-6.
- Carlsson HE, Hagelin J, Hau J. 2004: Implementation of the 'Three Rs' in biomedical research. *Vet Rec*, 154, 467-470.
- Claire A, Richardson, Paul A. et al., 2005: Anesthesia and Post-operative Analgesia Following Experimental Surgery in Laboratory Rodents: Are We Making Progress? *Altern Lab Anim*, 33, 119–127.
- Gil AG, Silvan G, Illera M, Illera JC, 2004: The effects of anesthesia on the clinical chemistry of new zealand white rabbits. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 43, 25-29.
- Henke J, Astner S, Brill T et al., 2005: Comparative study of three intramuscular anesthetic combinations (medetomidine/ketamine, medetomidine/fentanyl/midazolam and xylazine/ketamine) in rabbits. *Vet Anaesth Analg*, 32, 261–270.
- Kaur P, Kim K, 2008: Pharmacokinetics and brain uptake of diazepam after intravenous and intranasal administration in rats and rabbits. *Int J Pharm*, 364, 27-35.
- Kohn DF, Martin T, 2007: Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 46, 97–108.
- Li L, Gorukanti S, Choi YM, Kim KH, 2000: Rapid-onset intranasal delivery of anticonvulsants: pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation in rabbits. *Int J Pharm*, 199, 65-76.
- Moghadam AZ, Sadegh AB, Sharifi S, Habibian S, 2009: Comparison of intranasal administration of diazepam, midazolam and xylazine in Pigeons: Clinical evaluation. *Iran J Vet Sci Tec*, 1, 19-26.
- Rozanska D, 2009: Evaluation of medetomidine-midazolam-atropine (MeMiA) anesthesia maintained with propofol infusion in new zealand white rabbits. *Pol J Vet Sci*, 12, 209-216.
- Santangelo B, Micieli F, Mozzillo T, et al., 2016a: Transnasal administration of a combination of dexmedetomidine, midazolam and butorphanol produces deep sedation in New Zealand White rabbits. *Vet Anaesth Analg*, 43, 209-214.
- Santangelo B, Micieli F, Marino F, et al., 2016b: Plasma concentrations and sedative effects of a dexmedetomidine, midazolam, and butorphanol combination after transnasal administration in healthy rabbits. *J Vet Pharmacol Ther*, 39, 408-411.
- Vesal N, Eskandari MH, 2006: Sedative effects of midazolam and xylazine with or without ketamine and detomidine alone following intranasal administration in Ring-necked Parakeets. *J Am Vet Med Assoc*, 228, 383-388.

Vesal N, Zare P, 2006: Clinical evaluation of intranasal benzodiazepines,  $\alpha_2$ -agonists and their antagonists in canaries. *Vet Anaesth Analg*, 33, 143–148

Weiland LC, Kluge K, Kutter APN, et al., 2017: Clinical evaluation of intranasal medetomidine–ketamine and medetomidine–S(+)-ketamine for induction of anesthesia in rabbits in two centres with two

different administration techniques. *Vet Anaesth Analg*, 44, 98-105.

**\*Correspondance:** Zeynep BOZKAN

Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Aydın/Turkey.

**e-mail:** zbozkan@adu.edu.tr

## PKHD1 Geni Yanlış Anlam Mutasyonları Kedilerde Sebebi Bilinmeyen Böbrek Hastalıkları için Önemli Olabilir mi?

Nüket BİLGEN<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-2324-7965

Geliş Tarihi: 18.08.2021

Kabul Tarihi: 27.10.2021

**Özet:** Polikistik böbrek hastalığı (PKD), insanlarda otozomal resesif ve otozomal dominant olarak görülen heterojenik arka planı olan genetik bir hastalıktır. Kedilerde otozomal dominant PKD sıklıkla rapor edilirken, otozomal resesif PKD bildirilmemiştir. Tüm genom dizilemesi yapılmış olan siyam ırkı bir erkek kedide biyoinformatik analizler sonucunda *PKHD1* geninde çeşitli yanlış anlam mutasyonları tespit edilmiştir. Bu Siyam ırkı kedinin kastrasyon için özel bir veteriner kliniğine getirilmesinin ardından böbrek ve karaciğeri izlemek için geniş kan paneli yapıldı ve yüksek BUN ve kreatinin değerleri gözlemlendi. Ayrıca GPT değerinin de 2,5 kat olduğu belirlendi. Kedilerde nadiren *PKD1* mutasyonundan bağımsız kistik böbrek vakaları bildirilmektedir. Ancak otozomal çekinik polikistik böbrek hastalığına neden olan genler için kedi genomları daha önce incelenmemiştir. Bu çalışmada kedi genom verilerinde (n=100) otozomal resesif PKD'ye neden olan *PKHD1* geni incelenmiştir. İnceleme sonucunda SIFT skoru yüksek 4 farklı mutasyon belirlenmiş ve bu mutasyonların *PKHD1* geninden üretilen 7 transkriptte dur kodonu oluşumu ve dur kodonu kaybı ile sonuçlandığı ortaya konmuştur. Nadir hastalık olmasını destekler nitelikte, belirlenen mutasyonların frekanslarının 0.003, 0.001, 0.001 ve 0.003 olduğu hesaplanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Böbrek, Kedi, genom, *PKHD1* geni

### Could *PKHD1* Gene Missense Mutations Be Important for Idiopathic Kidney Disease in Cats?

**Abstract:** Polycystic kidney disease (PKD) is a genetic disease with a heterogeneous background seen in humans as autosomal recessive and autosomal dominant. While autosomal dominant PKD is frequently reported in cats, autosomal recessive PKD has not been reported. Various missense mutations in the *PKHD1* gene were detected as a result of bioinformatic analyzes in a male cat whose whole genome was sequenced. After this Siamese cat was brought to a private veterinary clinic for castration, a broad blood panel was performed to monitor kidney and liver, and elevated BUN and creatinine values were observed. In addition, the GPT value was determined to be 2.5 times higher. Cases of cystic kidney independent of *PKD1* mutation have been reported rarely in cats. However, cat genomes have not been previously examined for genes that cause autosomal recessive polycystic kidney disease. In this study, the *PKHD1* gene, which causes autosomal recessive PKD, was examined in cat genome data (n=100). As a result of the examination, four different mutations with high SIFT scores were identified. These mutations resulted in stop codon formation and loss of stop codons in 7 transcripts produced from the *PKHD1* gene. The frequencies of the determined mutations were calculated to be 0.003, 0.001, 0.001, and 0.003, which supports the fact that it is a rare disease.

**Keywords:** Cat, Genome, Kidney, *PKHD1* gene.

### Giriş

Böbrek yetmezliği kedilerde en sık görülen ve özellikle de ileri yaşlı kedilerde ölümlü sonuçlanabilen ya da ötenazi gerektirebilen bir hastalıktır. Özellikle Kronik Böbrek Hastalıkları görölme sıklığı kedinin ırkına da bağlı olarak %1,6-20 arasında değişmektedir (Chen ve ark., 2020). Kedilerde böbrek yetmezliği genetik kökenli ve çevresel nedenlere bağlı olarak gözlenebilmektedir (Gardner, 1988).

İnsanlarda genetik heterojeniteye sahip polikistik böbrek hastalığı (Polycystic Kidney Disease, PKD) hastalığı sıvı taşınması ve kemo- ve mekanik sensöriyal işlevi gören mikrotübül bazlı bir organel olan silyaların oluşumunda veya yapısında yer alan genlerde meydana gelen mutasyonlar ile

ilişkilendirilmiştir (Bilgen ve ark., 2020). Bu mutasyonlardan Polisistin-1 (*PKD1*), polisistin-2 (*PKD2*), nötral alfa-glukosidaz AB (*GANAB*, *PKD3*) ve DnaJ homolog alt ailesi B üyesi 11 (*DNAJB11*, *PKD6*) genlerinde olanlar otozomal dominant PKD ile ilişkilendirilmiştir. Fibrosistin (*PKHD1*, *PKD4*) ve çinko parmak proteini *DZIP1L* (*DZIP1L*, *PKD5*) genlerinde bulunan mutasyonlar ise hastalığın otozomal resesif versiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Kedilerde *Polisistin 1* (*PKD1*) geninde meydana gelen bir nokta mutasyonu protein dizisinde erken sonlanmaya neden olmaktadır ve bu mutasyon kedilerde otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı ile sonuçlanmaktadır (Lyons ve ark., 2004). Özellikle genç yaştaki kedilerde sıklıkla görülen



kronik böbrek yetmezliklerinin nedeni sadece *PKD1* geninde meydana gelen dominant mutasyonla ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Dolayısıyla çeşitli ülkelerde prevalans çalışmaları yürütülmüştür. Türkiye’de polikistik böbrek hastalığı prevalansı en yüksek İran kedileri ve bunlarla akrabalığı olan kedilerde %17,5 oranında belirlenmiştir (Bilgen ve ark., 2020). Ancak polikistik böbrek fenotipi görülmesine rağmen *PKD1* genindeki opal stop kodonu (UGA) oluşumuna neden olan mutasyonun belirlenmediği vakalar da bildirilmektedir (Bilgen ve ark., 2020; Guerra ve ark., 2015; Lee ve ark., 2010)

Kedi genom projesi (<https://felinegenetics.missouri.edu/>) Dünya’nın dört bir yanından bilim insanlarının yer aldığı bir projedir. Bu projeye katkı sağlayan araştırmalar genetik hastalıklara ve özelliklere neden olan mutasyon ve varyasyonları belirleme, kedilerin ve vahşi kedigillerin evrimini ve popülasyon dinamiklerini anlama ve kedilerimizin temel biyolojisini ve fizyolojisini anlama amaçlıdır. Bu amaçla yüzlerce kedinin tüm genom dizilemesi yapılmış ve konsorsiyum paydaşlarına sunulmuştur.

*PKHD1* geni böbrek epitel hücrelerinde siliogenesisi uyarmakta ve böbrek tubullerinin formasyonunda görev almaktadır. *PKHD1* geninden kedilerde 7 transkript oluşurken insanda 2 transkript oluşmaktadır. İnsanlarda çekinik özellikte aktarılan polikistik böbrek ve hepatik hastalığı tip1’e (*PKD4*) neden olan mutasyonların yer aldığı *PKHD1* geni, *PKD1* geni mutasyonunun bulunmadığı ama kistik böbrek oluşumu görülen kedilerde daha önce incelenmemiştir. Son yıllarda *PKD1* mutasyonu taşımayan kistik böbrek hastası kedilerin sayısındaki artış nedeniyle *PKHD1* genindeki mutasyonlar kedi genom konsorsiyumu verilerinde incelenmiş ve böbrek yetmezliği başlangıcı olan bir kedide tüm genom düzeyinde mutasyonlar taranmıştır.

## Materyal ve Metot

Kedi genomu konsorsiyumu veri setinin içinden akraba olmayan 100 adet kedi genomu rastgele seçilmiş ve *PKHD1* geninin bulunduğu B2 kromozomu 52,014,306-52,506,473 aralığındaki varyasyonlar filtrelenmiştir. Ayrıca tüm genom dizilemesi yapılmış ve daha önce yayınlanan polikistik böbrek hastalığına neden olan genlerin taraması (Bilgen ve ark., 2020) kapsamında *PKHD1* geninde homozigot mutasyonlar belirlenmiş olan erkek kedinin böbrek fonksiyon testleri yapılmıştır. Bu testler kastrasyon amacıyla kliniğe getirilmesi nedeniyle uygulanmıştır. Yapılan incelemede kan böbrek değerleri yüksek olarak ölçülmüştür. Çalışmada kullanılan veriler etik izne tabi değildir, bu çalışma için invaziv bir yöntemle örnekleme yapılmamıştır.

**Varyantların filtrelenmesi:** Kedi genom konsorsiyumu sekans verisinin işlenmesi, varyantların çağrılması ile ilgili yapılan çalışmalar Yu ve ark. (2020) ile Buckley ve ark. (2020)’nin çalışmalarında özetlenmiştir. Bu veri setinden elde edilen kodlanan bölgelerin bulunduğu Varyant dosyası (vcf) VarSeq (Golden Helix, Bozeman, MT) programı ile incelenmiştir. VarSeq ile vcf dosyası Ensembl 101 (20 Ağustos 2020) gen anotasyonu bilgilerine göre genlerin lokasyonları ve ekzon bilgileri atanmıştır. Ardından Ensembl veri tabanına vcf formatında Varyant Etki Tahmini aracına girilmiştir (McLaren ve ark., 2016). Ardından *PKHD1* geninde yüksek etkiye sahip olan varyantlar filtrelenmiş ve belirlenen varyantların in-slico fonksiyon analizleri yapılmıştır.

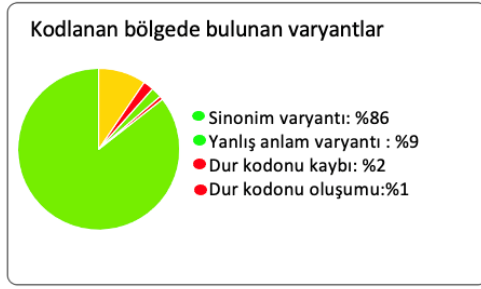
**SIFT analizi:** Varyantların tolerans edilme durumuna göre sıralamaya yarayan SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) skorlaması kullanılmıştır. SIFT, tolerans edilmeyen amino asit değişimlerini toleranslılardan ayıran ve bir proteindeki amino asit değişiminin fenotipik bir etkiye sahip olup olmayacağını dizi homolojisine göre tahmin eden bir araçtır (Sim ve ark., 2012). SIFT türler arasında proteinin farklılaşması ve fonksiyonunun da bununla ilişkili olarak değişmesi ilkesi ile çalışır. Buna göre fonksiyon için önemli konumlar, protein ailesinde korunmalıdır, önemsiz konumlarda ise dizilimde çeşitlilik görülebilmelidir. *PKHD1* geninde belirlenen varyasyonlardan SIFT değeri önemli olanlar incelenmiş farklı türlerde amino asit dizileri karşılaştırılmıştır.

## Bulgular

*PKHD1* geninde Y46H, S1811Y ve V3845I varyantlarını taşıyan siyam ırkı erkek üç yaşlı kedinin üre, kan üre azotu (Blood Urea Nitrogen, BUN), kreatinin ve Glutamat Piruvat Transaminaz (Glutamate Pyruvate Transaminase, GPT) değerleri iki-iki buçuk kat yüksek olarak ölçülmüştür.

B2 kromozomu 52,014,306-52,506,473 aralığında bulunan *PKHD1* geninde kodlanan ve kodlanmayan bölgeler dahil, toplamda 19,762 adet varyant belirlenmiştir. Bu varyantlar Ensembl veri tabanına yüklendiğinde 3,644 varyant filtrelenmiş ve 16,118 varyant kalmıştır. Varyantların %98’lik kısmı intron bölgelerde bulunmaktadır. Kodlanan kısımda kalan %2’lik varyantların ise %86’sı sinonim olduğu için protein düzeyinde bir etkiye sahip olmadığı, ancak %3’lük kısmının önemli etkiye sahip olduğu görülmüştür (Şekil 1). Tüm filtrelemeler sonrasında önemli etkisi olan 4 tane varyant belirlenmiştir (Tablo 1).

Belirlenen varyantların popülasyon düzeyinde incelendiğinde görülme sıklığı sırasıyla 0.003, 0.001, 0.001 ve 0.003 olduğu görülmüştür. Bu genin



Şekil 1. Kedi PKHD1 geni kodlanan bölgede bulunan mutasyonların dağılımı.

**Tablo 1.** Kedi PKHD1 geninde belirlenen önemli varyantların lokasyonu ve mutasyon bilgisi.

Kromozom ve lokasyon	Ref.	Alt.	Sonuç	SIFT Etki	Gen	Transkript	Mutasyon	Aminoasit dizisi
B2_52152361	G	T	Dur kodonu oluşumu	Yüksek	PKHD1	ENSFCAT0000009221.6	G/*	Gga/Tga
B2_52152719	A	G	Dur kodonu kaybı	Yüksek	PKHD1	ENSFCAT0000009221.6	*/W	tgA/tgG
B2_52303121	A	G	Dur kodonu kaybı	Yüksek	PKHD1	ENSFCAT0000009221.6	*/W	tgA/tgG
B2_52420224	A	G	Dur kodonu kaybı	Yüksek	PKHD1	ENSFCAT0000009221.6	*/W	tgA/tgG

## Tartışma ve Sonuç

Kediler de insanlar gibi kanser dahil diğer sık görülen ve nadir görülen hastalıklardan mustarıptır. Bu hastalıklara ya da özgün karakterlerin ortaya çıkmasına neden olan genetik alt yapının ortaya konulması amacıyla genom düzeyindeki çalışmalar kedi genom konsorsiyumu çatısı altında son yıllarda hız kazanmaya başlamıştır. Konsorsiyum çalışmaları sayesinde kedilerde cücelik (Lyons ve ark., 2019), kardiyomiyopati (Ontiveros ve ark., 2019), otozomal dominant siliopati (Cogne ve ark., 2020) gibi belirgin karakterler ve fenotiplerin genetik alt yapısı belirlenmiştir.

İnsanlarda görülen otozomal resesif polistik böbrek hastalığı (Autosomal recessive polycystic kidney disease, ARPKD) nadir genetik hastalıklar arasında yer almaktadır. İnsanlarda ARPKD'ye neden olan iki tane gen bulunmaktadır ve bu genlerde 300'den fazla mutasyon tanımlanmıştır (Hunt ve ark., 2018). Kedilerde sebebi bilinmeyen böbrek hastalıkları sıklıkla görülmektedir. Böbrek hastalıklarından kistik böbrek hastalığı genellikle PKHD1 genindeki mutasyon ile ortaya çıkmaktadır ancak nadiren de olsa PKHD1 geni mutasyonundan bağımsız kistik böbrek hastalıkları görülmektedir. Nadir görülen ve aile bilgisi olmayan sporadik durumlarda genetik ilişkilendirme çalışması gerçekleştirmek zor olmaktadır. Evcil hayvanların kayıt sistemlerindeki gelişmeler, güncel teknolojiler ile genom dizileme fiyatlarında zaman içerisinde gerçekleşen düşüş ile bu zorlukların aşılabileceği düşünülmektedir.

PKHD1 geninde belirlenen mutasyonların görülme sıklığının düşük olması nedeniyle bu gen

incelenmesine neden olan kronik böbrek hastası kedide ise mutasyonların belirlenen dört mutasyonun da homozigot olduğu görülmüştür. İncelenen 100 kedi genomunda bu mutasyonlardan dur kodonu kaybı ve dur kodonu oluşumu ile sonuçlanan B2: 52152361 ve B2: 52420224 pozisyonlarında bulunan nokta mutasyonları homozigot olan başka kedi belirlenmemiştir ancak bir kedide de mutasyonların heterozigot olarak taşıdığı görülmüştür.

mutasyonu kaynaklı PKD hastalıklarının kediler için de nadir hastalıklar grubunda değerlendirilmesi gerekmektedir. Belirlenen varyasyonların 3 tanesinin dur kodonu oluşumu ve 1 tanesinin dur kodonu kaybı olduğu görülmektedir. Güncel kedi genomunda belirlenen ve Ensembl VEP tabanında analiz edilen 128,844 ekzonik varyasyonun 838 tanesinin dur kodonu oluşumu ile 104 tanesinin ise dur kodonu kaybı ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Buckly ve ark., 2020b). İnsanlarda nadir görülen dur kodonu oluşumu ve dur kodonu kaybı mutasyonlarının türlerin adaptasyonu ve oluşumunda önemleri vurgulanmıştır (Monroe ve ark., 2021). PKHD1 geni ekzonik varyasyonlar içinde %3'lük payı temsil eden dur kodonu oluşumu ve dur kodonu kaybı mutasyonları kedi genomu ile kıyaslandığında oransal yüksektir. Kronik Böbrek Hastalıklarının kedilerde görülme sıklığı özellikle İran ırkı ve İran kedileri ile akrabalığı olan kedilerde yüksekken (Chen ve ark., 2020) diğer ırklar ve melez kedilerde nadiren ortaya çıkmaktadır. Bu göz önünde bulundurulduğunda belirlenen mutasyonların frekanslarının 0,001-0,003 nadir hastalık durumunu desteklediği düşünülmektedir.

Kedilerde PKHD1 geninde belirlenen 19,762 varyant VEP aracına yüklendiğinde 3,644 varyant filtrelenmiştir. Varyant filtreleme algoritmaları kullanılan programlar arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Yaklaşık 3,600 varyantın filtrelenmesi bu varyantların birden fazla konuma eşlenmesi durumunda, belirlenen allelin referans genomda bulunan allellerden farklı olması örneğin referans allel A/T iken belirlenen allelin G/C olması durumunda, bildirilen allel uzunluğundan farklı bir indel varyasyonu olması durumunda varyant

başarısız olarak işaretlenmekte ve filtrelenmektedir. Veri seti incelendiğinde işaretlenip filtrelenen 3,644 varyantın bahsedilen sebeplerden dolayı başarısız olarak işaretlendiği anlaşılmıştır. Ancak filtrelenen varyantların intron bölgelerine dağılmış olmasından dolayı protein düzeyinde etkisi olmayacağı düşünülmüştür.

*PKHD1* geninden insanlarda iki tane transkript oluşurken kedilerde 7 tane transkript tanımlanmıştır. Bu transkriptlerden insanda 4074 amino asit kodlayan ENST00000371117.8 transkripti ile kedide 4078 amino asit kodlayan ENSFCAT0000009221.6 transkriptler arası benzerlik oranı %80'dir (Hunt ve ark., 2018). Belirlenen varyasyonların amino asit rezidüleri değişimi ve insan genomunda belirlenen varyantların etkisi karşılaştırıldığında özellikle B2 52420224 pozisyonunda yer alan varyantında SIFT skorunun insan genomu karşılığının da yüksek olduğu görülmüştür (McLaren ve ark., 2016). Bu durum ilgili amino asitlerin protein için korunmuş bölgede yer aldığını düşündürmüştür.

Kedilerde sebebi bilinmeyen ve *PKD1* ilişkili olmayan kistik böbrek hastalıkları için insanlarda böbrek hastalıkları ile ilişkilendirilmiş araştırmalardan yola çıkarak aday genler tahmin edilebilir. Bu nedenle *PKHD1* geninde belirlenen ve fonksiyon kaybı, dur kodonu oluşumu kaybı, dur kodonu kazanımı gibi SIFT skoru yüksek mutasyonlar göz ardı edilmemeli ve *PKD1* mutasyonu olmayan ancak polikistik böbrek fenotipi görülen kedilerde ayrıca değerlendirilmelidir.

## Kaynaklar

Bilgen N, Bişkin Türkmen M, Çınar Kul B, Isparta S, Şen Y, Akkurt MY, Çıldır Ö Ş, Bars Z, 2020: Prevalence of PKD1 gene mutation in cats in Turkey and pathogenesis of feline polycystic kidney disease. *J Vet Diagn Invest*, 32 (4), 549–555.

Buckley RM, Gandolfi B, Creighton EK, Pyne CA, Bouhan DM, LeRoy ML, Senter DA, Gobble JR, Abitbol M, Lyons LA, 99 Lives Consortium, 2020a: Werewolf, There Wolf: Variants in Hairless Associated with Hypotrichia and Roaning in the Lykoi Cat Breed. *Genes (Basel)* 11 (6), 682.

Buckley RM, Davis BW, Brashear WA, Farias FHG, Kuroki K, Graves T, Hiller WL, Kremitzki M, Li G, Middleton RP, Minx P, Tomlinson C, Lyons LA, Murphy WJ, Warren WC, 2020b: A new domestic cat genome assembly based on long sequence reads empowers feline genomic medicine and identifies a novel gene for dwarfism. *PLoS Genet*, 16(10).

Chen H, Dunaevich A, Apfelbaum N, Kuzi S, Mazaki-Tovi M, Aroch I, Segev G, 2020: Acute on chronic kidney disease in cats: Etiology, clinical and

clinicopathologic findings, prognostic markers, and outcome. *J Vet Inter Med*, 34 (4), 1496-1506.

Cogne B, Latypova X, Senaratne LDS, Martin L, Koboldt DC, Kellaris G, Fievet L, Le Meur G, Caldari D, Debray D, Nizon M, Frengen E, Bowne S, 2020: Mutations in the kinesin-2 motor kif3b cause an autosomal-dominant ciliopathy. *Am J Hum Genet*, 106 (6), 893-904.

Gardner Jr KD, 1988: Cystic kidneys. *Kidney Int*, 33 (2), 610-621.

Guerra JM, Daniel AGT, Cardoso NC, Grandi F, Queiroga F, Cogliati B, 2015: Congenital hepatic fibrosis and polycystic kidney disease not linked to C> A mutation in exon 29 of PKD1 in a Persian cat. *JFMS open reports*, 1(2), 2055116915619191.

Hunt SE, McLaren W, Gil L, Thormann A, Schuilenburg H, Sheppard D, Parton A, Armean IM, Trevanion SJ, Flicek P, Cunningham F, 2018: Ensembl variation resources. *Database*, 2018(2018) bay119.

Lee YJ, Chen HY, Hsu WL, Ou CM, Wong ML, 2010: Diagnosis of feline polycystic kidney disease by a combination of ultrasonographic examination and PKD1 gene analysis. *Vet Rec*, 167 (16), 614-618.

Lyons LA, Fox DB, Chesney KL, Britt LG, Buckley RM, Coates JR, Gandolfi B, Grahn RA, Hamilton MJ, Middleton JR, Sellers ST, Villani NA, Pflueger S, 99 Lives Consortium, 2019: Localization of a feline autosomal dominant dwarfism locus: A novel model of chondrodysplasia. *bioRxiv*. 687210.

Lyons LA, Biller DS, Erdman CA, Lipinski MJ, Young AE, Roe BA, Qin B, Grahn RA, 2004: Feline polycystic kidney disease mutation identified in PKD1. *J Am Soc Nephrol*, 15(10), 2548-2555.

McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GR, Thormann A, Flicek P, Cunningham F, 2016: The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol*, 6, 17(1), 122.

Monroe JG, McKay JK, Weigel D, Flood PJ, 2021: The population genomics of adaptive loss of function. *Heredity*, 126 (3), 383-395.

Ontiveros ES, Ueda Y, Harris SP, Stern JA, 99 Lives Consortium, 2019: Precision medicine validation: Identifying the mybpc3 a31p variant with whole-genome sequencing in two maine coon cats with hypertrophic cardiomyopathy. *J Feline Med Surg* 21 (12), 1086-1093.

Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC, 2012: SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.*, 40(W1), W452-W457.

Yu Y, Creighton EK, Buckley RM, Lyons LA, 99 Lives Consortium, 2020: A Deletion in GDF7 is Associated with a Heritable Forebrain Commissural Malformation Concurrent with Ventriculomegaly and Interhemispheric Cysts in Cats. *Genes (Basel)*, 11(6), 672.

\*Yazışma Adresi: Nüket BİLGİN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

e-mail: nbilgen@ankara.edu.tr

## Carcass Characteristics and Physical Meat Quality Properties of Spent Broiler Breeder Hens and Commercial Spent Layer Hens

Metin PETEK<sup>1,a,\*</sup>, Enver ÇAVUŞOĞLU<sup>1,b</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Bursa Uludag, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0001-8789-3101, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-9018-3511

Geliş Tarihi: 16.09.2021

Kabul Tarihi: 07.11.2021

**Abstract:** This study was conducted to investigate the carcass characteristics and physical meat quality properties of spent broiler breeder, commercial spent white, and commercial spent brown layer hens. Ten samples from each genotype were analyzed for muscle pH, meat colour characteristics, and carcass yield performance. Meat colour analyses were performed on skinned and skinless breast and thigh meat samples, while meat pH was measured on skinned meat samples. The percentage of the breast meat of carcass was significantly higher for broiler breeder hens than for white and brown layer hens ( $P<0.001$ ), while wing meat percentage was significantly lower for these birds ( $P<0.005$ ). There were significant differences in the lightness value of skinned layer breast meat ( $P<0.016$ ). Skinned redness ( $P<0.001$ ), skinned chroma ( $P<0.001$ ), skinless lightness ( $P<0.001$ ), and skinless chroma ( $P<0.002$ ) values of thigh meat were significantly affected by the genotype of spent layer hens. The spent breeder hens had significantly lower pH levels for leg and breast meat ( $P<0.001$ ). In conclusion, it seems that the carcass and meat quality characteristics of the spent laying hens differed. The spent layer meat might be an alternative meat for consumer as breast and leg meat or processed meat.

**Keywords:** *Carcass yield, laying hen, meat quality.*

### Damızlık ve Ticari Yumurtacı Tavuklarda Karkas Özellikleri ve Et Kalitesi

**Özet:** Bu çalışma, etçi damızlık, ticari beyaz ve kahverengi yumurtacı tavuklarda karkas özellikleri ve fiziksel et kalitesi özelliklerini araştırmak amacı ile yapılmıştır. Her genotipten on örnek alınarak karkas özellikleri ile et pH ve renk özellikleri için analiz edilmiştir. Et rengi ölçümleri; derili ve derisiz göğüs ve but eti örneklerinde yapılırken, et pH'sı derili et örneklerinde ölçülmüştür. Damızlık tavuklarda göğüs eti randımanı; beyaz ve kahverengi yumurtacı tavuklara göre önemli ölçüde daha yüksek ( $P<0.001$ ), kanat eti randımanı ise önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur ( $P<0.005$ ). Derisiz göğüs eti parlaklık değeri bakımından gruplar arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir ( $P<0.016$ ). Derili but eti renk özelliklerinden kırmızılık ( $P<0.001$ ), kroma ( $P<0.001$ ) ile derisiz but eti parlaklık ( $P<0.001$ ) ve kroma ( $P<0.002$ ) değerleri genotipten önemli ölçüde etkilenmiştir. Etçi damızlık tavuk but ve göğüs etinde pH önemli düzeyde daha düşük bulunmuştur ( $P<0.001$ ). Sonuç olarak, kasaplık yumurtacı tavuklarda karkas ve et kalitesi özellikleri birbirinden farklı olup, yumurtacı tavuk etleri, göğüs ve but eti veya işlenmiş et olarak tüketiciler için alternatif bir et olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Et kalitesi, Karkas verimi, Yumurtacı tavuk.*

### Introduction

The commercial value of end of lay hens as breeder or commercial has been considered negligible throughout the World, in general. There has been an increasing interest in taking spent layer meats into the consumption chain. Although some of the carcasses of the spent hens are offered for consumption in some countries, most of them are slaughtered and then sent for rendering to be converted into protein meals for animal feed (Hamm, 1976). Even if it is not consumed directly, using these hens after egg production to produce processed meat products or a special recipe for a large consumption scale could benefit to the poultry market (De Souza et al., 2011, Karakaya et al., 2010; Kadioğlu et al., 2019). Polizer Rocha et al. (2019) showed that the substitution of up to 75% of chicken meat by spent laying hen meat did not

decrease consumers' sensory acceptance of the sausages. Bhaskar Reddy (2016) showed that spent breeder meat is superior for preparing processed and value-added chicken meat products than spent layer and broiler meat. In general, the meat quality of poultry has been mainly studied for commercial broiler, turkey, and quail (Dos Santos et al., 2020; Özbek et al., 2020; Zampiga et al., 2020). Muthulakshmi et al. (2016) reported significant differences in meat pH between larger and smaller weight groups due to differences in the body weight of culled layer hen. Since it does not have enough economic benefit, the meat quality of end of laying hens, neither breeder nor commercial, has not been studied in detail. Revealing more detail about the meat quality of spent hens will increase consumer demand and producer income. This study aims to

evaluate the carcass characteristics, and meat quality of spent broiler breeders and commercial layers raised and slaughtered under commercial conditions.

## Material and Methods

The study was conducted in the carcass evaluation and meat quality analysis laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine in the University of Bursa Uludag. The experimental procedures do not require ethical permission according to Animal Experiments Ethics Committees Regulation on Working Procedures and Principles, Article 8 19-k (Bursa Uludag University, 2020-07/03).

### 1. Layers, slaughter, and sample collection:

Ten whole carcasses from each layer (broiler breeder, commercial brown and white layer flocks) were randomly collected after commercial slaughter (HSA, 2013; TS 5925, 2014; Nielsen, 2019). During the slaughter process, the birds were electrically stunned in a water bath and scalded with hot water (55-58 °C for 2.5-4 minutes) after bleeding. The birds' feathers were removed mechanically with a rotary drum for 4 minutes and advanced to an evisceration. The eviscerated carcass was chilled at 4 °C for at least 30 minutes. The whole carcasses were kept in a box during transportation to the laboratory with a minimum delay time. Laboratory investigations started four hours after postmortem and comprised weighing the carcass parts and measuring of physical meat quality parameters.

### 2. Data:

At first, the whole carcasses were weighed, and the carcass parts as necks, two wings, whole breast, and two skinned legs were removed from the whole carcasses (TS 5890, 2014). The cuts were weighed, and the yields were calculated as a percentage of carcass weight. Measured meat quality traits were consistent with meat pH and meat colour properties and were carried out on the medial surface, bone side, of the left breast meat and left leg muscle (Keskin et al., 2017). The pH was

taken with a pH meter from the direct surface of the skinned samples (ExStik PH100 pH-meter, Extech Instruments). Meat colour characteristics were performed on skinned and skinless breast and leg samples. After the pH and meat colour measurement, the visible skin was trimmed from the samples for the skinless evaluation of meat colour characteristics. The colour determination of the samples was performed with a colorimeter (PCE-XXM 20, PCE Instruments LTD) programmed with standards of the International Commission on Illumination (CIE  $L^*a^*b^*$  system, D65 illuminant, 10°) at an angle of 90° after the colorimeter was calibrated. The  $L^*$  value represents a degree of lightness component (0:black to 100; white). The redness ( $a^*$ ) and the yellowness ( $b^*$ ) both range from -60 to +60, with  $a^*$  ranging from green if negative to red if positive and  $b^*$  ranging from blue if negative to yellow if positive (Krallik et al. 2018). After that, the chroma,  $C^*=(a^{*2}+b^{*2})^{0.5}$  and arctan values (hue angle,  $h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*) \cdot 180/\pi$ ) were calculated for each meat sample (Ingram ve ark. 2008).

**3. Statistics:** The statistical tests were performed by SPSS®, computer software 23.00 (IBM Corp Released., 2015). ANOVA test was used to analyse the effects of genotype on carcass characteristics, meat pH and colour parameters. Tukey test was used for post hoc analysis (Snedecor and Cochran, 1989).

## Results

Mean values for the carcass characteristics of spent broiler breeder hens and spent layer hens were presented in table 1. Significant differences were observed in the carcass weight, leg weight, wing weight, breast weight, and neck weight of spent broiler and layer hens ( $P<0.001$ ,  $P=0.006$ ). The wing and breast meat percentages were significantly different among the groups ( $P=0.005$ ,  $P<0.001$ ).

**Table 1.** Means ( $\pm$ SEM) of carcass characteristics of spent broiler breeder hens, white and brown spent layer hens.

Parameters	Broiler Breeder	White Layer	Brown Layer	P Values
Carcass Weight, g	3545.6 $\pm$ 78.5 <sup>a</sup>	1432.8 $\pm$ 27.4 <sup>c</sup>	1880.4 $\pm$ 60.8 <sup>b</sup>	<0.001
Thigh Weight, g	1492.6 $\pm$ 41.8 <sup>a</sup>	587.0 $\pm$ 31.1 <sup>c</sup>	828.8 $\pm$ 27.2 <sup>b</sup>	<0.001
Wing Weight, g	323.8 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup>	152.0 $\pm$ 6.0 <sup>c</sup>	201.6 $\pm$ 6.3 <sup>b</sup>	<0.001
Breast Weight, g	1394.6 $\pm$ 31.1 <sup>a</sup>	403.7 $\pm$ 13.7 <sup>c</sup>	675.0 $\pm$ 23.2 <sup>b</sup>	<0.001
Neck Weight, g	189.0 $\pm$ 20.2 <sup>a</sup>	113.7 $\pm$ 17.0 <sup>b</sup>	110.6 $\pm$ 15.9 <sup>b</sup>	0.006
**Thigh, %	42.1 $\pm$ 1.0	41.16 $\pm$ 2.4	44.08 $\pm$ 0.4	0.417
**Wing, %	9.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	10.6 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	10.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	0.005
**Breast, %	39.4 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	28.2 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	35.9 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	<0.001
**Neck, %	5.3 $\pm$ 0.5	7.8 $\pm$ 1.2	5.8 $\pm$ 0.7	0.411

\*a-c ; means with different superscripts that vary significantly within the same row.

\*\* Calculated as a percentage of cold carcass weight.

Table 2 shows the colour parameters of leg meat from the spent broiler and layers. There were significant differences for redness ( $P<0.001$ ) and chroma ( $P<0.001$ ) values of skinned leg meat and

for skinless lightness ( $P<0.001$ ), redness ( $P=0.044$ ), and chroma ( $P=0.002$ ) values of leg meat of spent broiler breeders and layers.

**Table 2 :** The average values ( $\pm$ SEM) for colour parameters of thigh meat of spent broiler and layers.

Factors	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*$	$h^0$
<b>Skinned meat</b>					
Broiler Breeder	79.25 $\pm$ 0.81	22.14 $\pm$ 3.93 <sup>a</sup>	0.32 $\pm$ 0.67	23.80 $\pm$ 3.41 <sup>b</sup>	-0.00 $\pm$ 0.07
Commercial	81.48 $\pm$ 1.39	31.05 $\pm$ 3.86 <sup>a</sup>	2.32 $\pm$ 1.02	32.14 $\pm$ 3.53 <sup>b</sup>	-0.05 $\pm$ 0.09
White Layer					
Commercial	79.20 $\pm$ 0.68	44.26 $\pm$ 1.69 <sup>b</sup>	1.55 $\pm$ 0.73	44.42 $\pm$ 1.67 <sup>a</sup>	-0.04 $\pm$ 0.01
Brown Layer					
<i>P Value</i>	0.198	0.001	0.076	0.001	0.907
<b>Skinless meat</b>					
Broiler Breeder	61.50 $\pm$ 1.56 <sup>a</sup>	22.45 $\pm$ 4.80 <sup>b</sup>	4.77 $\pm$ 1.17	28.53 $\pm$ 2.92 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.11
Commercial	54.19 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>	9.00 $\pm$ 2.62 <sup>a</sup>	7.11 $\pm$ 1.49	14.93 $\pm$ 2.01 <sup>b</sup>	0.56 $\pm$ 0.15
White Layer					
Commercial	55.37 $\pm$ 1.20 <sup>b</sup>	14.75 $\pm$ 3.27 <sup>ab</sup>	6.84 $\pm$ 1.56	19.24 $\pm$ 2.75 <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.19
Brown Layer					
<i>P Value</i>	0.001	0.044	0.458	0.002	0.119

\*a-c ; means with different superscripts that vary significantly within the same column  
 $L^*$ ;Lightness,  $a^*$ ;Redeness,  $b^*$ ;Yellowness,  $C^*$ ; Chroma,  $h^0$ ;Hue.

The colour properties of layer breast meat are presented in table 3. There were no significant effects of layer type on skinned and skinless colour parameters of breast meat of spent broiler breeder, brown and white spent hen, except lightness ( $L^*$ )

values ( $P=0.016$ ). The commercial white layer hens had significantly higher skinned breast meat lightness values than brown layer and broiler breeder hens.

**Table 3.** Means ( $\pm$ SEM) for the colour properties of breast meat, with/without skin, of spent broiler and commercial layers.

Factors	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*$	$h^0$
<b>Skinned meat</b>					
Broiler Breeder	73.36 $\pm$ 1.47 <sup>b</sup>	25.17 $\pm$ 5.78	0.75 $\pm$ 0.68	25.53 $\pm$ 5.64	0.09 $\pm$ 0.06
Commercial	80.03 $\pm$ 2.17 <sup>a</sup>	29.98 $\pm$ 8.08	0.33 $\pm$ 1.42	31.56 $\pm$ 7.43	0.20 $\pm$ 0.13
White Layer					
Commercial	78.39 $\pm$ 1.01 <sup>ab</sup>	33.91 $\pm$ 3.48	4.35 $\pm$ 2.25	35.39 $\pm$ 2.81	0.19 $\pm$ 0.10
Brown Layer					
<i>P Value</i>	0.016	0.576	0.073	0.440	0.075
<b>Skinless meat</b>					
Broiler Breeder	55.33 $\pm$ 1.26	17.62 $\pm$ 3.54	7.96 $\pm$ 1.04	20.05 $\pm$ 3.24	0.50 $\pm$ 0.11
Commercial	55.21 $\pm$ 2.02	13.00 $\pm$ 5.80	7.96 $\pm$ 1.49	17.74 $\pm$ 5.17	0.36 $\pm$ 0.24
White Layer					
Commercial	58.33 $\pm$ 1.88	27.93 $\pm$ 4.32	4.12 $\pm$ 1.76	29.00 $\pm$ 4.11	0.18 $\pm$ 0.10
Brown Layer					
<i>P Value</i>	0.377	0.086	0.119	0.161	0.411

\*a-b ; means  $\pm$  SEM with different superscripts that vary significantly within the same column  
 $L^*$ ;Lightness,  $a^*$ ;Redeness,  $b^*$ ;Yellowness,  $C^*$ ; Chroma,  $h^0$ ;Hue.

The means for meat pH of skinless leg and breast layer meat are shown in table 4. There were significant differences in leg and breast meat pH

between the groups. Broiler breeder hens had lower leg ( $P<0.001$ ) and breast meat ( $P<0.001$ ) pH compared to commercial laying hens.

**Table 4.** The meat pH values ( $\pm$ SEM) of thigh and breast meat of spent layers.

Genotype	Thigh	Breast
Broiler Breeder	6.09 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	6.15 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>
Commercial White Layer	6.28 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	6.60 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
Commercial Brown Layer	6.35 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	6.37 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
<i>P Value</i>	<0.001	<0.001

\*a-c ; means with different superscripts that vary significantly within the same column.

## Discussion

Poultry meat quality is affected by several factors as genotype, housing condition, production system, slaughter age, nutrition, etc. (Del Bosque et al., 2020; Özbek et al., 2020; Semwogerere et al., 2018). As in commercial conditions, the slaughter age, nutrition, and housing condition of broiler breeder and commercial brown and white layer hens for carcass and meat quality analysis were different from each other in this study (Yalçın et al., 2020). In commercial conditions, the broiler breeder is slaughtered at 64 weeks of age, while layer hens are slaughtered after 72-95 weeks of age depending on performance and egg price (Lohman Tierzucht Management Guide 2019, 2020; Aviagen, 2021). The housing conditions and nutrition of breeder and commercial laying hens are different in practice. The broiler breeder was commonly housed in barn systems, while the commercial layers were housed in conventional battery cages.

There were significant differences in carcass and portion weights of layer hens in this study due to different body weights. As expected, broiler breeder hens' carcass weight was significantly greater than commercial brown and white layer hen. In commercial conditions, broiler chickens exhibit superior weight gain and have higher meat yields than laying hens. The body weight significantly affects the meat yield and some of the meat quality of culled layer hens (Kondaiah and Panda, 1992; Muthulakshmi et al., 2016). If we compare with commercial broiler, it can be said that broiler breeder carcass is above broiler marketing weight, brown ones are slightly below, and white ones are below the minimal marketing weight for broiler carcass (Aviagen, 2021). If a comparison is made with the carcass weight of the brown layer and hybrids are like that of slow-growing ones

(Ozbek et al., 2020). Therefore, marketing breeder meats as portioned or processed products would be more appropriate, whereas commercial layers as whole carcasses.

The poultry meat colour is one of the essential visual factors affecting consumers' decisions because it reflects the freshness of the meat (Wideman et al., 2016). Many factors such as genetic, age at slaughter, sex, indoor conditions, poultry diet, and pre-slaughter stress condition etc. affect poultry meat colour (Albrecht et al., 2019; Qamar et al., 2019; Siekman et al., 2018;). In this study, lightness values of skinned breast meat of commercial layers were significantly greater (lighter) than broiler breeder breast meat. Increased slaughter age is also characterized by a change in the colour attributes of meat being darker, redder, or yellower when compared to the younger hens (Yalçın et al., 2020).

The muscle type and skin are the main issues related to raw poultry meat colour; breast meat has a pale and pink colour, while the thigh meat expresses dark and red (Mir et al., 2017). If we compared to thigh and breast meat, the layer breast meat was found lighter than leg meat in all spent layers in our study. Cruz et al. (2018) showed that broiler thigh meat had a greater hue angle, chroma, brightness, and redness values than breast meat. Compared skinned and skinless meat lightness and yellowness colour parameters of breast and thigh meat, the skinned breast and thigh meat was lighter and yellower than skinless meat. The skinned thigh meat redness value was more remarkable in broiler breeder (Dunlop et al., 2016) while it was darkest in skinned spent layer meat ( $P<0.044$ ).

The meat pH values of thigh and breast meat of the broiler breeder were significantly lower than commercial layers, which could be attributed to the

lower body weight of the commercial layers and pre-slaughter handling. The meat pH directly relates to the meat quality attributes such as tenderness, meat colour, and shelf life (Mir et al., 2017). Fletcher (1995) reported a correlation between the colour of the broiler breast fillets and the meat pH, and the pH of meat can be easily identified by meat colour (Anadon, 2002). Frizzel et al. (2018) reported strain differences for muscle meat pH and redness values of end of lay hens. Limpisophon et al. (2019) reported that the breast meat pH of spent layers was lower than commercial broiler meat.

## Conclusion

The findings of this study provide baseline information for the carcass yields and meat quality of spent laying hens for the poultry industry and the consumers. Variability of meat quality characteristics were mainly related to genotype. However, it should be taken into account that the differences in terms of meat quality may have also been affected by the housing system, slaughter age, and nutrition, etc. If spent layer meat can be put into the consumption chain in any way, it can help compensate for some of the disadvantages of end of lay hens as lower economic values. In particular, free-range or organic spent laying hen meats may be evaluated in this way, and layer meats could be a good option for consumers looking for an alternative to broiler chicken meat.

## Author contributions

MP planned this research, collected and analyzed the samples, and wrote the article. EÇ collected and analyzed the samples.

## Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest for this paper.

## Acknowledgement

We want to thank the slaughterhouse staff for their help with this study.

## References

Albrecht A, Hebel M, Heinemann C, Herbert U, Miskel D, Saremi B, Kreyenschmidt J, 2019: Assessment of meat quality and shelf life from broilers fed with different sources and concentrations of methionine. *J. Food Qual*, 1, 1–10.

Anadon HLS, 2002: Biological, nutritional, and processing factors affecting breast meat quality of broilers,

Ph.D. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, 24061, USA, pp:181.

Aviagen, 2021: Parent Stock Ross 308 Parent Stock Performance Objectives. [https://en.aviagen.com/assets/Tech\\_Center/Ross\\_PS/Ross308-ParentStock-PerformanceObjectives-2021-EN.pdf](https://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_PS/Ross308-ParentStock-PerformanceObjectives-2021-EN.pdf) (last access 27.04.2021).

Bhaskar Reddy GV, Naga Mallika E, Obula Reddy B, Azad SAK, Maheswara Reddy, D, 2016: Comparison on meat quality characteristics of spent breeder, layer and broiler birds. *Int J Sci Environ Technol*, 5, 2590 – 2595.

Cruz FL, Silva AA, Machado IFM, Vieira LC, Estevez C, Fassani EJ, Faria PB, 2018: Meat quality of chicken of different crossing in alternative system. *Arq Bras Med Vet Zootec* 70, 254–262.

De Souza KMR, Araujo RB, Santos AL, Rodrigues CEC, Faria DE, Trinade MA, 2011: Adding Value to the Meat of Spent Laying Hens Manufacturing Sausages with a Healthy Appeal *Rev Bras Ciênc Avic*, 13, 57–63 doi:10.1590/S1516-635X2011000100009.

Del Bosque CI, Altman BA, Ciulu M, Halle I, Jansen S, Nolte T, Weigend S, Mörlein D, 2020: Meat Quality Parameters and Sensory Properties of One High-Performing and Two Local Chicken Breeds Fed with Vicia faba. *Foods*, 9, 1052. doi:10.3390/foods9081052

Dos Santos TC, Gates RC, Tinoco FF, Estrada MM, Chizzotti ML, 2020: Meat quality traits of European quails reared under different conditions of temperature and air velocity. *Poult Sci*, 99, 848-856 <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.037>

Dunlop MW, Moss AF, Groves PJ, Wilkinson SJ, Stuetz RM, Selle PH, 2016: The multidimensional causal factors of 'wet litter' in chicken-meat production. *Sci Total Environ*, 562, 766-776 doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.03.147.

Fletcher DL, 1995: Relationship of breast meat color variation to muscle pH and texture, *Poult Sci*, 74(Suppl.), 120 (Abstr.).

Frizzell KM, Jendral MJ, Maclean IM, Dixon WT, Putman CT, 2018: Physicochemical determinants of pH in pectoralis major of three strains of laying hens housed in conventional and furnished cages. *Br Poult Sci*, 59, 286-300.

Hamm D, 1976: Use of Spent Laying Hens in Rendered Products. *Poult Sci*, 55, 399-402.

Ingram DR, Hatten LF, Homan KD, 2008: A Study on the relationship between eggshell color and eggshell quality in commercial broiler breeders. *Int J Poult Sci*, 7, 700–703.

Kadioğlu P, Karakaya M, Unal K, Babaoğlu AS, 2019: Technological and textural properties of spent chicken breast, drumstick and thigh meats as affected by marinating with pineapple fruit juice. *Br Poult Sci*, 60 (4), <https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1621990>

Karakaya M, Yetişir R, Aygün A, Yılmaz MT, Tiske SS, 2019: Effects of Proteolytic Enzymes of Plant Origin to the Carcass of White and Brown Egg Laying Chickens Completed Their Second Laying Cycle on Some Meat Quality Properties (In Turkish with English abstract) *Hayvansal Üretim*, 51(2), 44-49.



- Kralik G, Kralik Z, Grcevic M, Hanzek D, 2018: Quality of chicken meat, in: Animal Husbandry and Nutrition, edited by: Banu Yücel, Book Chapter in Animal Husbandry and Nutrition, IntechOpen, <https://doi.org/10.5772/intechopen.69938>.
- Keskin M, Setlek P, Demir S, 2018: Use of Color Measurement Systems in Food Sci. and Agriculture. Int. Adv.Res. & Engineering Congress. 16-18 November.
- Kondaiah N, Panda B, 1992: Processing and utilization of spent hens. *World's Poult Sci J*, 48 (3). <https://doi.org/10.1079/WPS19920020>
- Limpisophon K, E-tun S, Koeipudsa C, Charoensuk D, Malila Y, 2018: Characterization of Breast Meat Collected from Spent Lohmann Brown Layers in Comparison to Commercial Ross Broilers. *Rev Bras Cienc*, 21(3), <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0941>
- Lohman Tierzucht Management Guide, 2019: Lohman Brown-Classic Layers Management Guide Cage Housing, 12/19. (Last Access 27.04.2021)
- Lohman Tierzucht Management Guide, 2020: Lohman LSL-Classic Layers Management Guide Cage Housing, 02/20. (Last Access 27.04.2021)
- Mir NA, Rafiq A, Kumar F, Singh V, Shukla V, 2017: Determinants of broiler chicken meat quality and factors affecting them: a review. *J Food Sci Technol*, 54, 2997–3009.
- Muthulakshmi M, Muthukumar M, Rajkumar RS, Girish PS, Mooventhan P, 2016: Carcass characteristics and meat quality attributes of commercial culled layer hen. *Int J Sci Environ Technol*, 5, 3352-3361.
- Özbek M, Petek M, Ardıclı S, 2020: Physical quality characteristics of breast and leg meat of slow- and fast-growing broilers raised in different housing systems. *Arch Anim Breed*, 63, 337–344, <https://doi.org/10.5194/aab-63-337-2020>
- Qamar A, Mohyuddin SG, Hamza A, Lartey KA, Shi CO, 2019: Physical and chemical factors affecting chicken meat color. *Pakistan J Sci*, 71, 82-88.
- Polizer Rocha YJ, Lorenzo JM, Barros JC, Baldin JC, Trindade MA, 2019: Effect of chicken meat replacement by spent laying hen meat on physicochemical properties and sensorial characteristics of fresh sausage. *Br Poult Sci*, 60, 139-145, doi: 10.1080/00071668.2019.1568392.
- Semwogerere F, Neethling J, Muchenje V, Hoffman LC, 2018: Effects of production systems on the carcass and meat quality characteristics of spent laying hens. *Poult Sci*, 6, 1990-1997.
- Siekman L, Meier-Dinkel L, Janisch S, Altmann B, Kaltwasser C, Sürle C, Kriscsek C, 2018: Carcass Quality, Meat Quality and Sensory Properties of the Dual-Purpose Chicken Lohmann Dual. *Foods*. 7, 156.
- Snedecor GW, Cochran WG, 1989: *Statistical Methods*. Eighth Edition, Iowa State University Press.
- IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- TS 5925, 2014: Poultry Rules for slaughtering and carcass preparation. Institute of Turkish Standards. Ankara, Turkey.
- TS 5890, 2014: Poultry Carcass-Rules for carcass dissecting. Institute of Turkish Standards, Ankara, Turkey.
- Wideman N, O'Bryan CA, Crandall PG, 2016: Factors affecting poultry meat colour and consumer preference-A Review. *World's Poult Sci J*, 72, 353-366. <https://doi.org/10.1017/S0043933916000015>
- Yalçın S, Onbaşlar EB, Ramay MS, 2020: Effects of slaughter age and cage type on carcass and meat characteristics of laying hens. *Europ Poult Sci*, 84, DOI: 10.1399/eps.2020.310
- Zampiga M, Soglia F, Baldi G, Petracci M, Strasburg GM, Sirri F, 2020: Muscle Abnormalities and Meat Quality Consequences in Modern Turkey Hybrids. *Front. Physiol*, <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00554>

\*Correspondence: Metin Petek

Department of Animal Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Bursa Uludag, Turkey.

e-mail: petek@uludag.edu.tr

## Calculation of The Intracranial Volume in Gazelles (*Gazella subgutturosa*) by Stereology and Computed Tomography

İsmail DEMİRCİOĞLU<sup>1,a</sup>, Ali KOÇYİĞİT<sup>2,b,\*</sup>, Sedat AYDOĞDU<sup>2,c</sup>, Nazan GEZER İNCE<sup>3,d</sup>, Bestami YILMAZ<sup>1,e</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Harran University, Şanlıurfa, Turkey

<sup>2</sup>Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University, Konya, Turkey

<sup>3</sup>Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul University-Cerrahpasa, Istanbul, Turkey

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-0724-3019, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-9354-7480, <sup>c</sup>ORCID: 0000-0002-9354-3519,

<sup>d</sup>ORCID: 0000-0003-1627-5757, <sup>e</sup>ORCID: 0000-0002-0901-3129

Geliş Tarihi: 07.10.2021

Kabul Tarihi: 28.10.2021

**Abstract:** The danger of extinction faced by the gazelles, which show a broad geographical distribution, in recent times and inclusion of the gazelles in the conservation list of IUCN indicate the importance and necessity of the studies on continuity of the species. In this context, the determination of intracranial volume is clinically essential for the breed and sexual dimorphism. In the present study the crania of 11 gazelles (5 male and 6 female gazelles) (*Gazella subgutturosa*) were used. The cranium of the gazelles were scanned at 80 kV, 200 mA, 639 mGY, and 0.625 mm section thickness using 64-slice Multi-Detector Computed Tomography (MDCT). The intracranial volume of the gazelles was estimated using computed tomography sections according to Cavalieri's Principle. Three-dimensional models of the intracranial area were created using MIMICS 20.1 Software, the software calculated intracranial volume. The obtained results were statistically tested in terms of both methods and sexual dimorphism. The study results revealed that crania showed no difference between sexes ( $P>0.05$ ). No difference was detected between the two methods in statistical analysis of the intracranial volumes calculated using stereology and CT models. Consequently, it was considered that the use of intracranial volumes of the gazelles would contribute to the clinical sciences concerning detection, diagnosis and progression of the diseases.

**Keywords:** 3D modeling, Gazelle subgutturosa, Intracranial volume, Neurocranium, Stereology.

### Ceylanlarda (*Gazella subgutturosa*) Intracranial Hacmin Stereoloji ve Bilgisayarlı Tomografi ile Hesaplanması

**Özet:** Geniş bir coğrafyada yaygınlık gösteren ceylanlar, son zamanlar neslin tükenme tehlikesiyle karşı karşıya kalması ve IUCN tarafından korunmaya alınması, türün devamı için çalışmaların önemli ve gerekli olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda intracranial hacmin bilinmesi klinik yönden, ırk ve cinsiyet ayırımı için önemlidir. Çalışmamızda 11 adet (5 erkek, 6 dişi) ceylan (*Gazella Subgutturosa*) craniumu kullanıldı. Ceylanların craniumları 64-dedektörlü Multi Dedektör Bilgisayarlı Tomografi (MDCT) cihazında 0.625 mm kesit kalınlığında, 80 kV, 200 mA ve 639 mGY ile tarandı. Ceylanların cranial hacimleri bilgisayarlı tomografi kesitleri kullanılarak Cavalieri prensibi ile ölçüldü. Ayrıca MIMICS 20.1 software yazılımı kullanılarak intracranial alanın 3 boyutlu modelleri elde edildi ve program üzerinde hacim hesaplandı. Elde edilen sonuçlar hem yöntemler hem de cinsiyet ayırımı açısından istatistiksel olarak test edildi. Çalışmada craniumların cinsiyetler arasında farklılık göstermediği tespit edildi ( $P>0.05$ ). Ayrıca, stereoloji ve BT modelleri ile hesaplanan cranial hacimlerin istatistiksel olarak incelenmesinde iki metot arasında fark olmadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, ceylanların intracranial hacimlerinin kullanılarak hastalıkların tanı, tespit ve seyri açısından klinik bilimlere katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** 3B modelleme, Gazelle subgutturosa, intracranial hacim, Neurocranium, Stereoloji.

### Introduction

*Gazella subgutturosa* is a species that exhibits distribution in broad geography extending from Mongolia to Turkey and inhabits at an altitude up to 3500 meters (Heptner et al., 1998; Mallon and Kingswood, 2001). Because of its decreasing population, *Gazella subgutturosa* was included in the red list of the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) and classified as vulnerable (IUCN, 2017).

Cranium is a structure formed mainly by paired bones covering sensory organs such as taste, antler,

scent, vision, and balance (Evans ve De Lahunta., 2013; König ve Liebich., 2020). Its health condition is affected parallelly with the normal functioning of the vital organs it contains (Din et al., 2020; Schofield et al., 1995). The cranial cavity involves the brain, liquor cerebrospinalis, blood vessels and is surrounded by cavum cranii (Evans ve De Lahunta., 2013; König ve Liebich., 2020; Rodrigues et al., 2017). It is clinically significant to know the intracranial volume and cranial capacity, and brain volume should be known for diagnosis and follow-

up of some neurodegenerative diseases (Schofield et al., 1995). Knowing the cranial capacity may be used in the breed and sexual dimorphism (Rushton, 1994). Different methods such as stereology, planimetry, anthropometry, plant seeds, magnetic resonance, and computed tomography imaging are applied to calculate intracranial volume (Acer et al., 2007; Choudhary et al., 2015; Ertekin et al., 2016; Mendoza et al., 2014).

Stereology is applied in various fields such as anatomy, cell biology, geology, and botany and is one of the practical methods to analyze several two-dimensional sections randomly obtained from three-dimensional solid materials (Baddeley, 1991; Russ ve Dehoff, 2000). Cavalieri's Principle is a method applied to calculate the total volume of the irregular-shaped structures and organs such as the brain using randomly obtained parallel and equal sections (Canan et al., 2002; Gundersen et al., 1988). This method is also used with imaging methods such as Computed Tomography (CT) and Magnetic Resonance Imaging (MRI) (Odacı et al., 2005). The measurement of tumor volumes using this method before and after treatment provides advantages to the physicians regarding the progression of the diseases (Ak et al., 2010).

CT is one of the medical imaging methods that was developed in 1970s and rapidly advanced. It processes the data collected from the area X-ray passes through in the computer and creates sectional images. Three-dimensional (3D) models are created using 2-dimensional (2D) sectional images obtained by CT sections, and consequently, studies can be conducted on these models (Romans, 2018; Wang, 2009).

The present study aimed to calculate the volume of the cranial cavity in the gazelles (*Gazella*

*Subgutturosa*) utilizing 3-dimensional models obtained by the stereological and CT sections and to calculate statistically the difference between the methods in terms of sex according to the obtained results. It was also aimed to contribute to the limited literature in this field by comparing the results of the present study with the intracranial volumes identified in the studies on different breeds and species.

## Materials and Method

In the present study, the crania of 11 adult gazelles (five males, six females) (*Gazella Subgutturosa*) were used. The General Directorate of Nature Conservation and National Parks Turkey approved using the cadavers (Approval no: 2017/209842) and the study had approval from Harran University Animal Experimentation Local Ethics Committee (Approval no: 2018/006-11).

The gazelles' cranium was scanned at 80 kV, 200 mA, 639 mGY, and 0.625 mm section thickness using a 64-slice Multi-Detector Computed Tomography (MDCT). Prokop (2003) and Kalra (2004) were accepted as references for scanning and dose protocols. The reconstruction of the cranium was performed by MIMICS 20.1 (The Materialise Group, Leuven, Belgium) software from the images recorded in the format of DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine).

The margins of the intracranial cavity were determined using the sections taken from CT in MIMICS 20.1 software. The sections of the determined area were used to create 3-dimensional models. The volumetric values of the created models were recorded (Figure 1A).

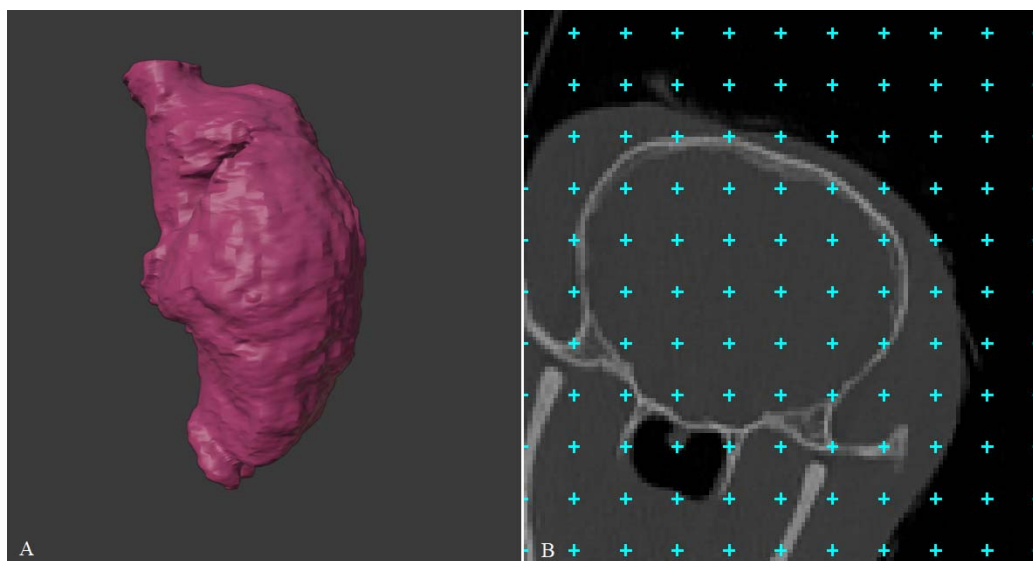
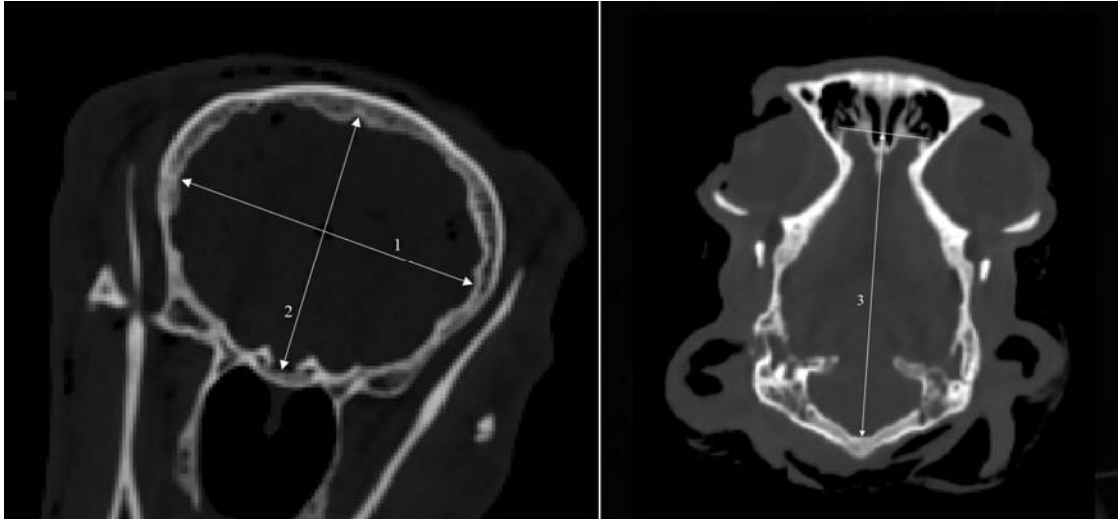


Figure 1: 3D modeling of the intracranial cavity (A), A point-counting grid that superimposed on CT slice (B).



**Figure 2:** Maximum width of the cranial cavity (1), Maximum height of cranial cavity (2), Maximum length of the cranial cavity (3).

The cranial margins were detected by stereology method, and 12 sections were obtained in each gazelle by using a systematic random sampling method from CT sections of these sites. The obtained section images were counted with 81 mm<sup>2</sup> intervals by using the "Grid" option on the "ImageJ" software and calculated according to Cavalier's principle. The same procedure was repeated three times to be calculated at different times (Figure 1B). Intracranial volumes were estimated using the following equation:

$$V = \sum p \times t \times a(p)$$

Measurements are taken from the cranial cavity:

Figure 2: Measurement of the cranial cavity.

1- MWCC: Maximum width of the cranial cavity,

2- MHCC: Maximum height of the cranial cavity,

3- MLCC: Maximum length of the cranial cavity

Index 1 (Cranial cavity index): maximum width of the cranial cavity x 100 / maximum length of cranial cavity

Index 2 (Length width index): maximum length of cranial cavity / maximum width of the cranial cavity (Kunzel et al., 2003; Onar et al., 2002).

The coefficient of error (CE) was estimated by

taking Sahin et al., (2001), Roberts et al., (1993), and Gundersen and Jensen (1987) as reference.

Statistical analysis of the data was carried out using SPSS 21.0 software. The data were found to be normally distributed. An independent t-test was applied to determine the difference between sexes, while paired t-test was used to detect the difference between the methods.

## Results

Table 1 shows the total mean intracranial volumes obtained by stereology and computed tomography. The calculation of total volumes of males and females by computed tomography and stereological methods is presented in Table 2. The study results revealed that female gazelles had higher total intracranial volume than the males; however, no statistical difference was found between sexes ( $P > 0.05$ ). Although the total mean intracranial volume was higher in the models obtained by computed tomography, no statistical difference was determined between the two methods ( $P > 0.05$ ). Although there was a difference between Index 1 and Index 2, no statistical difference was detected.

Table 1: Comparison of intracranial volume estimated by the two methods.

Method	N	Minimum (cm <sup>3</sup> )	Maximum (cm <sup>3</sup> )	Mean	Std. dev.	Sig.	Correlation
Computed Tomography	11	68.20	87.81	80.51	6.89	0.14	0.98
Stereology	11	67.03	88.10	79.88	7.46		

**Table 2:** Estimation of intracranial volume by different methods and genders.

Method	Gender	n	Minimum (cm <sup>3</sup> )	Maximum (cm <sup>3</sup> )	Mean	Std. dev.	Sig	CE
Stereology	Female	6	67.03	87.67	80.80	8.01	0.74	0.03
	Male	5	67.60	88.10	78.77	7.50		
Computed Tomography	Female	6	68.34	87.81	81.38	7.21	0.85	0.03
	Male	5	68.20	87.56	79.48	7.16		

Although the cranial cavity was longer in male gazelles, no statistical difference was found between the sexes ( $P>0.05$ ). A difference was

present between indices calculated based on cranial cavity parameters; however, no statistical difference was observed ( $P>0.05$ ).

**Table 3:** Parameter of the cranial cavity.

Parameter		n	Minimum (mm)	Maximum (mm)	Mean	Std. dev.	Sig
MWCC	Female	6	50.77	54.61	53.40	1.38	0.28
	Male	5	50.81	54.25	52.41	1.48	
MHCC	Female	6	40.27	47.21	43.39	3.10	0.80
	Male	5	41.52	45.98	42.99	1.73	
MLCC	Female	6	73.47	81.45	76.83	3.17	0.14
	Male	5	74.04	87.58	81.15	5.64	
Index 1	Female	6	65.34	73.89	69.63	3.89	0.63
	Male	5	60.49	68.63	64.77	3.65	
Index 2	Female	6	1.35	1.53	1.43	0.08	0.61
	Male	5	1.46	1.65	1.54	0.08	

## Discussion

Cavalieri's Principle is one of the methods preferred in calculation of the volumes of the geometrical objects of different shapes with high accuracy and is also used together with different imaging techniques such as MRI or CT (Roberts et al., 1993; Sahin and Ergur, 2005; Yılmaz and Tuğrul, 2019).

The present study aimed to calculate the total intracranial volumes by the models obtained from the computed tomography sections and stereological method. High compatibility was identified between these two methods. Dello et al. (2007) stated in their study that ImageJ software could be used in stereological calculations. Rodrigues et al. (2017) conducted a study on goats and determined that the volumes of the intracranial cavity were  $123.94\pm 9.84$  cm<sup>3</sup> and  $114.64\pm 12.72$  cm<sup>3</sup> in male and female goats, respectively. No statistical difference was identified between the sexes, similarly with the present study. Sarma (2006) studied 45 Kagani goats without sex discrimination and calculated intracranial volume as

$113\pm 0.84$  cm<sup>3</sup>. Logan and Clutton-Brock (2013) calculated the endocranial volumes of the red deers as  $370\pm 39$  cm<sup>3</sup> using computed tomography and software. In addition, endocranial volume measurements obtained by the bead method and computed tomography scans revealed similar results. Chanpanitkitchote et al. (2015) carried out their study on some different species without sex discrimination. They calculated the cranial volumes as 0.172 lt, 0.314 lt, 0.171 lt, 0.162 lt,  $0.197\pm 0.013$  lt, and  $0.145\pm 0.009$  lt in Sitatunga, Malayan tapir, chital gazelles, Muntiacus muntjac, Grant's gazelle, and sheep, respectively. Choudray and Singh (2015), who used cotton to calculate cranial capacity in their morphometric study on the crania of the blackbucks, estimated the cranial capacities of female and male antelopes to be  $106.33\pm 0.04$  cm<sup>3</sup> and  $109.33\pm 1.08$  cm<sup>3</sup>, respectively, and they carried out no statistical comparison. Karimi et al, (2011) calculated the cranial capacity of Mehraban sheep as  $130.86\pm 11.55$  cm<sup>3</sup> using rice grains, and sexes were not considered. Ömer and Alpak (2012) calculated the cranial capacity of female and male curly-fleeced sheep to be respectively  $133.89\pm 10.82$  cm<sup>3</sup> and  $136.10\pm 17.281$  cm<sup>3</sup> in their study. They

noted parallelly with the present study that no difference was detected between the sexes (36). Tohidfar et al. (2020) determined the cranial cavity as  $423 \pm 48.2 \text{ cm}^3$  using the computed tomography and stereology approach in Saanen goats.

Regedon et al. (1991) calculated the cranial volumes of the dogs from different breeds using computed tomography. They stated that sexes could be differentiated based on cranial volume at the rate of 99%. No difference was identified between the sexes in the present study.

In the present study, we tried to calculate the cranial cavity volume in the gazelles (*Gazella subgutturosa*) using different methods. In the present study, there was no statistical difference between stereology and computed tomography concerning the calculation of cranial cavity, and similar results were obtained using the two methods. Therefore one of these two methods can be used in the studies to be conducted in these fields. It is thought that the present study would contribute to the studies on the intracranial field and subjects such as the clinical approach.

## References

- Acer N, Sahin B, Bas O, Ertekin T, Usanmaz M, 2007: Comparison of three methods for the estimation of total intracranial volume: stereologic, planimetric, and anthropometric approaches. *Ann Plas Surg*, 58 (1), 48-53.
- Ak G, Metintas M, Metintas S, Yildirim H, Ozkan R, Ozden H, 2010: Three-dimensional evaluation of chemotherapy response in malignant pleural mesothelioma. *Eur J Radiol*, 74 (1), 130-135.
- Baddeley A, 1991: Spatial Statistics and Digital Image Analysis, 181-216. National Research Council, Washington DC, USA.
- Canan S, Şahin B, Odacı E, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S, 2002: Toplam hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanılan bir stereolojik yöntem: Cavalieri prensibi. *Turk Klin J Med*, 22, 7-14.
- Chanpanitkitchote P, Tangphokhanon W, Nomsiri R, Kaewmong P, Kongteung P, Nganvongpanit K, 2015: Ratio of cranial and skull volumes in 25 mammalian species. *Vet Integr Sci*, 13 (3), 165-177.
- Choudhary OP, Singh I, 2015: Morphometrical Studies on the Skull of Indian Blackbuck (*Antelope cervicapra*). *J Morphol*, 33 (3), 868-876.
- Choudhary OP, Singh I, Bharti SK, Mohd KI, Sathapathy S, Mrigesh M, 2015: Gross and Morphometrical Studies on Mandible of Blackbuck (*Antelope cervicapra*). *J Morphol*, 33 (2), 428-432.
- Dello SA, van Dam RM, Slangen JJ, van de Poll MC, Bemelmans MH, Greve JWW, Beets-Tan RGH, Wigmore SJ, Dejong, CH, 2007: Liver volumetry plug and play: do it yourself with ImageJ. *World J Surg*, 31 (11), 2215-2221
- Din S, Masood S, Zaneb H, Rehman H, Ashraf S, Khan I, Shah M, Hadi SA, 2020: Gross and clinical anatomy of the skull of adult chinkara (*Gazella bennettii*). *Pak J Zool*, 52 (5), 123-1733.
- Ertekin T, Acer N, Köseoğlu E, Zararsız G, Sönmez A, Gümüş K, Kurtoğlu E, 2016: Total intracranial and lateral ventricle volumes measurement in Alzheimer's disease: A methodological study. *J Clin Neurosci*, 34, 133-139.
- Evans HE, De Lahunta A, 2013: Miller's anatomy of the dog. 4th ed., Elsevier Health Sciences., Missouri, USA
- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard B, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ, 1988: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96 (1-6), 379-394.
- Gundersen HJG, Jensen EB, 1987: The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*, 147 (3), 229-263.
- Haluk Ö, Alpak H, 2012: Kıvrıkcık Koyunlarında Stereolojik Metotla Cranial Hacim Hesaplanması ve Bunun Kraniyometrik Ölçümleri ile İlişkisi. *İstanbul Univ Vet Fak Derg*, 38 (2), 107-119.
- Heptner VG, Nasimovich AA, Bannikov AG, 1988: Mammals of the Soviet Union. Artiodactyla and Perissodactyla. Smithsonian Institution Libraries and The National Science Foundation, 1:1-1147 (translation from Russian).
- IUCN SSC Antelope Specialist Group. 2017. *Gazella subgutturosa*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T8976A50187422. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T8976A50187422.en>. Date of access; 05 September 2021.
- Kalra MK, Maher MM, Toth TL, Hamberg LM, Blake MA, Shepard JA, Saini S, 2004: Strategies for CT radiation dose optimization. *Radiology*, 230 (3), 619-628.
- Karimi I, Onar V, Pazvant G, Hadipour M, Mazaheri Y, 2011: The cranial morphometric and morphologic characteristics of Mehraban sheep in Western Iran. *Glob Vet*, 6 (2), 111-117.
- König HE, Liebich HG, 2020: Veterinary anatomy of domestic animals: Textbook and colour atlas. Georg Thieme Verlag, New York, USA
- Künzel W, Breit S, Oppel M, 2003: Morphometric investigations of breed-specific features in feline skulls and considerations on their functional implications. *Anat Histol Embryol*, 32 (4), 218-223.
- Logan CJ, Clutton-Brock TH, 2013: Validating methods for estimating endocranial volume in individual red deer (*Cervus elaphus*). *Behav Processes*, 92, 143-146.
- Mallon DP, Kingswood SC, 2001: Antelopes. Part 4: North Africa, the Middle East, and Asia. Global Survey and Regional Action Plans. SSC Antelope Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, England
- Mendoza CS, Safdar N, Okada K, Myers E, Rogers G F, Linguraru MG, 2014: Personalized assessment of craniosynostosis via statistical shape modeling. *Med Image Anal*, 18 (4), 635-646.

- Odacı E, Bahadır A, Yıldırım Ş, Şahin B, Canan S, Baş O, Bilgiç S, Kaplan S, 2005: Cavalieri prensibi kullanılarak bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleri üzerinden hacim hesaplanması ve klinik kullanımı. *Türkiye Klin J Med*, 25 (3), 421-428.
- Onar V, Kahvecioğlu KO, Çebi V, 2002: Computed tomographic analysis of the cranial cavity and neurocranium in the German shepherd dog (Alsatian) puppies. *Vet Arh*, 72 (2), 57-66.
- Prokop M, 2003: General principles of MDCT. *Eur J Radiol* 45:4-10.
- Regodon S, Franco A, Garin JM, Robina A, Lignereux Y, 1991: Computerized tomographic determination of the cranial volume of the dog applied to racial and sexual differentiation. *Cells Tissues Organs*, 142 (4), 347-350.
- Roberts N, Cruz-Orive LM, Reid NMK, Brodie DA, Bourne M, Edwards RHT, 1993: Unbiased estimation of human body composition by the Cavalieri method using magnetic resonance imaging. *J Microsc*, 171 (3), 239-253.
- Rodrigues RTS, Matos WCG, Walker FM, Costa FS, Wanderley CWS, Neto JP, Faria M D, 2017: Dimensions of the cranium and of the cranial cavity and intracranial volume in goats (*Capra hircus* LINNAEUS, 1758). *J Morphol Sci*, 27 (1), 6-10.
- Romans L, 2018: Computed tomography for technologists: a comprehensive text. Lippincott Williams & Wilkins.
- Rushton JP, 1994: Sex and race differences in cranial capacity from International Labour Office data. *Intelligence*, 19 (3), 281-294.
- Russ JC, Dehoff RT, 2000: Practical stereology. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Sahin B, Aslan H, Unal B, Canan S, Bilgiç S, Kaplan S, Tunkaya L, 2011: Brain volumes of the lamb, rat and bird do not show hemispheric asymmetry: a stereological study. *Image Anal Stereol*, 20 (1), 9-13.
- Sahin B, Ergur H, 2006: Assessment of the optimum section thickness for the estimation of liver volume using magnetic resonance images: a stereological gold standard study. *Eur J Radiol*, 57 (1), 96-101.
- Sarma K, 2006: Morphological and craniometrical studies on the skull of Kagani goat (*Capra hircus*) of Jammu region. *Int J Morphol*, 24 (3), 449-55.
- Schofield PW, Mosesson RE, Stern Y, Mayeux R, 1995: The age at onset of Alzheimer's disease and an intracranial area measurement: a relationship. *Arch Neurol*, 52 (1), 95-98.
- Tohidifar M, Goodarzi N, Masoudifard M, 2020: Anatomy of the head in the Saanen goat: a computed tomographic and cross-sectional approach. *Anat Sci Int*, 95 (3), 408-419.
- Wang H, 2009: Three-dimensional medical CT image reconstruction. In 2009 International Conference on Measuring Technology and Mechatronics Automation. Zhangjiajie, Hunan, China, Vol. 1, pp. 548-551.
- Yılmaz O, Tuğrul T, 2019: Van kedilerinde total beyin hacminin bilgisayarlı tomografi görüntüleri kullanılarak hesaplanması. *Eurasian J Bio Chem Sci*, 2 (2), 42-46.
- \*Correspondence:** Ali KOÇYİĞİT  
Selçuk University Faculty of Veterinary, Department of Anatomy, Selçuklu, Konya.  
**e-mail:** kcygtali@outlook.com

## Treatment of Cats Distal Diaphyseal and Supracondylar Femur Fractures with Dynamic Intramedullary Cross Pinning Technique

Metehan Turan CEBECİ<sup>1,a</sup>, Birkan KARSLI<sup>1,b,\*</sup>

<sup>1</sup>Kirikkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Kirikkale, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-2890-1113, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0003-4208-3134

Geliş Tarihi: 11.10.2021

Kabul Tarihi: 10.11.2021

**Abstract:** This study was conducted on 12 cats with 11 supracondylar femur fractures and one distal diaphyseal femur fracture. Fracture properties, operation details, postoperative complications, and radiographic images of the cases were recorded. The supracondylar fractures in the study were classified according to Salter-Harris, and they were determined as type I in 1, Type II in 7, and Type IV in 3 of them. Dynamic intramedullary cross pinning technique was applied to patients with Salter-Harris type II, type I and distal diaphyseal femur fractures, dynamic intramedullary cross pinning, and intercondylar screw application, as for that, was applied to patients with Salter-Harris type IV fractures. It was observed that 8 of the 12 patients who were operated on used their extremities after removing the bandage on the relevant extremity. In two patients with Salter-Harris type IV fractures, lameness was observed due to fractures in other regions, but extremity movement returned to normal after healing the bone. A patient with a Salter-Harris type IV fracture, due to the extent of the damage to the joint as a result of trauma, had narrowing and limping in the joint angle. In a patient with a Salter-Harris type I fracture, pin migration occurred five days after the operation, and the cross-pinning technique was applied in a second operation. In consequence of the findings, it was observed that the dynamic intramedullary cross pinning technique was influential in the treatment of supracondylar femur fractures in cats.

**Keywords:** Cat, Femur, Intramedullary pinning, Treatment.

### Kedilerin Distal Diyafizer ve Suprakonduler Femur Kırıklarının Dinamik Intramedüller Çapraz Pin Tekniği ile Tedavisi

**Özet:** Bu çalışma, 11 adet suprakondiler femur kırığı ve 1 adet distal diafizer femur kırığı tespit edilen 12 kedide gerçekleştirilmiştir. Olguların, kırık özellikleri, operasyon detayları, operasyon sonrası oluşan komplikasyonlar ve radyografik görüntüleri kaydedilmiştir. Çalışmadaki suprakondiler kırıklar Salter-Harris'e göre sınıflandırılmış olup; 1 tanesinde tip I, 7 tanesinde Tip II, 3 tanesinde Tip IV kırığı belirlenmiştir. Kırıklardan Salter-Harris tip II, tip I ve distal diafizer femur kırığı olan hastalara dinamik intramedüller çapraz pin tekniği uygulanmış, Salter-Harris tip IV kırığı olanlara ise dinamik intramedüller çapraz pin ve interkonduler vida uygulaması yapılmıştır. Operasyonu gerçekleştirilen 12 hastanın 8'inde ilgili ekstremitedeki bandajın çıkarılmasından sonra ekstremitelerini kullandıkları tespit edildi. Salter-Harris tip IV kırığı olan 2 hastada diğer bölgelerdeki kırıklar sebebi ile topallık görüldü fakat kemik iyileşmesi tamamlandıktan sonra ekstremitte hareketinin normale döndüğü görüldü. Salter-Harris tip IV kırığı olan bir hastada travma sonucu eklemdeki hasarın büyüklüğü sebebiyle eklem açısında daralma ve topallama görüldü. Salter-Harris tip I kırığı olan bir vakada operasyondan 5 gün sonra pin migrasyonu gerçekleşti ve ikinci bir operasyon yapılarak çapraz pin tekniği uygulandı. Elde edilen bulgular sonucunda kedilerde oluşan suprakondiler femur kırıklarının tedavisinde dinamik intramedüller çapraz pin tekniğinin etkin olduğu görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Femur, İntramedüller pin, Kedi, Tedavi.

### Introduction

Supracondylar fractures are more often seen in young patients (Rathnadiwakara et al., 2020). These fractures are mostly encountered as isolated fractures involving the distal metaphyseal region of the femur. Besides, these fractures may present as multi-component fractures accompanied by corpus and condyle fractures (Chandler and Beale, 2002). Due to the localization of the fracture, anatomical reduction and stabilization of this type of fracture can be difficult. Minimal dissection should be

performed to ensure early bone healing and continuity of regional alimentation. Supracondylar fractures are fractures that can be anatomically reduced and stabilized, or biological osteosynthesis can be achieved with a minimally invasive technique (Beale, 2004; Fossum, 2013).

Intramedullary pins, plates, external fixators, and screws are used in the treatment of distal femur fractures. For all that, the technique of osteosynthesis with the intramedullary pin has



found a wide area in the treatment of fracture operations, and it cannot be used in the treatment of distal femur fractures due to the short distal fragment, segmental or near-joint fractures (Beale, 2004; Chandler and Beale, 2002; Ramesh et al., 2018; Scotti, 2007; Zahn and Matis, 2004). Due to these reasons, different techniques were used to perform pin stabilization of distal femoral fractures. These techniques used Kirshner (K) wires, or Steinman pins were used crosswise to pass from the medial and lateral condyle to the proximal fragment, or rush-style and dynamically crossed to pass through the intramedullary canal (Simpson and Lewis, 2003). External fixators can be used in the treatment of this type of fracture; however, they are not preferred much in bones such as femur and humerus due to the presence of dense muscle mass around them and their anatomically close position to the body (Langley-Hobbs et al., 1996; Worth, 2007).

Distal physeal fractures usually occur in young patients who have not completed their bone development, and Salter-Harris type II fractures are common among these fractures. The treatment of distal physeal fractures is usually provided with pins. However, any configuration that will create pressure on the physis during reduction is tried to be avoided (Beale, 2004). Different pins oriented along the fracture line from the lateral of the medial and lateral condyles are deflected from the opposite cortex of the diaphysis and directed proximally, and the remaining pins in the distal fragment are cut as short as possible and buried at the bone level. This placement method is called the dynamic intramedullary crosspinning technique. Dynamic intramedullary crosspinning technique has been reported to give good results in supracondylar fractures or distal diaphyseal fractures (Sukhiani and Holmberg, 1997). In the condyle fractures involving the articular surface accompanying supracondylar fractures, stabilization should be achieved by open reduction. The condition of condyle fractures may be more complex and difficult than observed on preoperative radiographs. To reduce or prevent the development of osteoarthritis, it is essential to achieve the complete anatomical reduction of the condyle. In cases where condyle fractures are suitable for operation, rigid reduction and stabilization should be achieved by using one or more lag screws and anti-rotational wires (Beale, 2004).

In the study conducted, it is aimed to treat distal diaphyseal and supracondylar femur fractures commonly occurring in cats with the dynamic intramedullary cross-pinning technique, which is easy to apply, inexpensive in terms of cost, and provides good stabilization and reduction.

## Material and Method

A document was obtained from the ethics committee of Kırıkkale University Animal Experiments stating that there was no need for an ethics committee for this study (2021/31). The informed consent form was obtained from the owners of the animals included in the study. The age, gender, weight, race, localization of the fracture, and how it was shaped were recorded in our study. The heart rate and respiratory rate, rectal temperatures, mucosal colors, and capillary filling times of the cats used in each case were recorded. Palpation of the affected bone, presence of crepitation, soft tissue damage, and neurological examination of the extremities was performed. Blood was collected from each patient for a preoperative complete blood count. This hematological examination was performed to learn the general condition of the patient and to prevent a possible complication that may occur in the postoperative period.

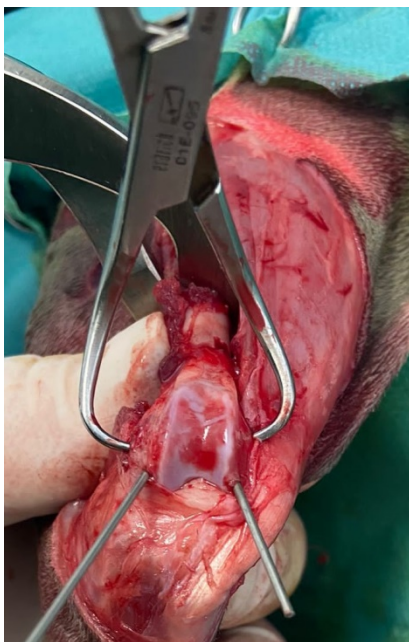
Orthogonal preoperative radiographs were taken to determine the location and type of the fracture and to make the Salter-Harris classification. Preoperatively, the affected limb was immobilized with a modified Robert Jones bandage (RJB) until operation. The patient was operated on during the period when the patient's health condition was suitable for operation. Food restriction was applied to the animal 12 hours before the operation, and no water restrictions were applied.

In preparation for the operation, an intravenous cannula was placed into the cephalic vein first. For pre-anesthesia, 0.08 mg/kg medetomidine (domitor, zoetis, USA) and 0.2 mg/kg butorphanol (Butomidor, Richter Pharma, Austria) were administered intramuscularly (im). 5-7.5 mg/kg dose of ketamine (Ketasol, Interhas, Turkey) was injected im. After the induction, an endotracheal tube was placed through the orotracheal route, and anesthesia was continued with 1-2% isoflurane (Isoflurane, Piramal, USA) using a semicircular inhalation device (SMS Company, Turkey). The animal was placed in a side-lying position with the relevant extremity on top. The extremity was shaved from the tarsal joint to the lumbosacral region, and necessary disinfection procedures were performed. In the postoperative period, amoxicillin (Synulox, Pfizer, USA) subcutan (sc) at a dose of 10mg/kg for one week and meloxicam (Maxicam, Sanovel, Turkey) sc at a dose of 0.3mg/kg for 3 days was administered.

Various types (1-2 millimeter (mm) thickness) of K-wires made of stainless steel (LC 316) were used in our study. In the preoperative period, the width of the canal at the narrowest point of the

medullary canal (isthmus point) was measured from the radiographic images, and a wide K-wire size was chosen to fill 60-70% of this channel in total.

Supracondylar femur fractures were repaired using the dynamic intramedullary cross-pinning technique. After the necessary incisions were made, to better visualize the fracture line, the joint was flexed, and the fragments were reduced. K-wires were placed crosswise from the lateral and medial sides of the sulcus trochlearis, and their progression was ensured by contacting the opposite cortex along the intramedullary canal, and fracture fixation was complete (Figure 1). The fracture line and joint area were washed with isotonic sodium chloride (0.9%) and closed according to the incision line technique.



**Figure 1:** Intraoperative view of pin insertion to the femur condyle.

Postoperative care RJB was applied to the operated extremity for 2-3 weeks by changing it once a week. Skin sutures were removed after 14 days. Owners of the patient were instructed to keep the patient at cage rest for 30 days and to perform a passive movement (flexion and extension) of the affected limb after removal of the RJB to improve joint motion.

Cranio-caudal and mediolateral images of the involved extremity were taken immediately after the operation. Follow-up radiographs were taken at regular intervals (2 weeks - 12 weeks). Radiographs taken were evaluated for the status of fracture reduction, stability of the implant, progression of fracture healing, and any complications that may occur.

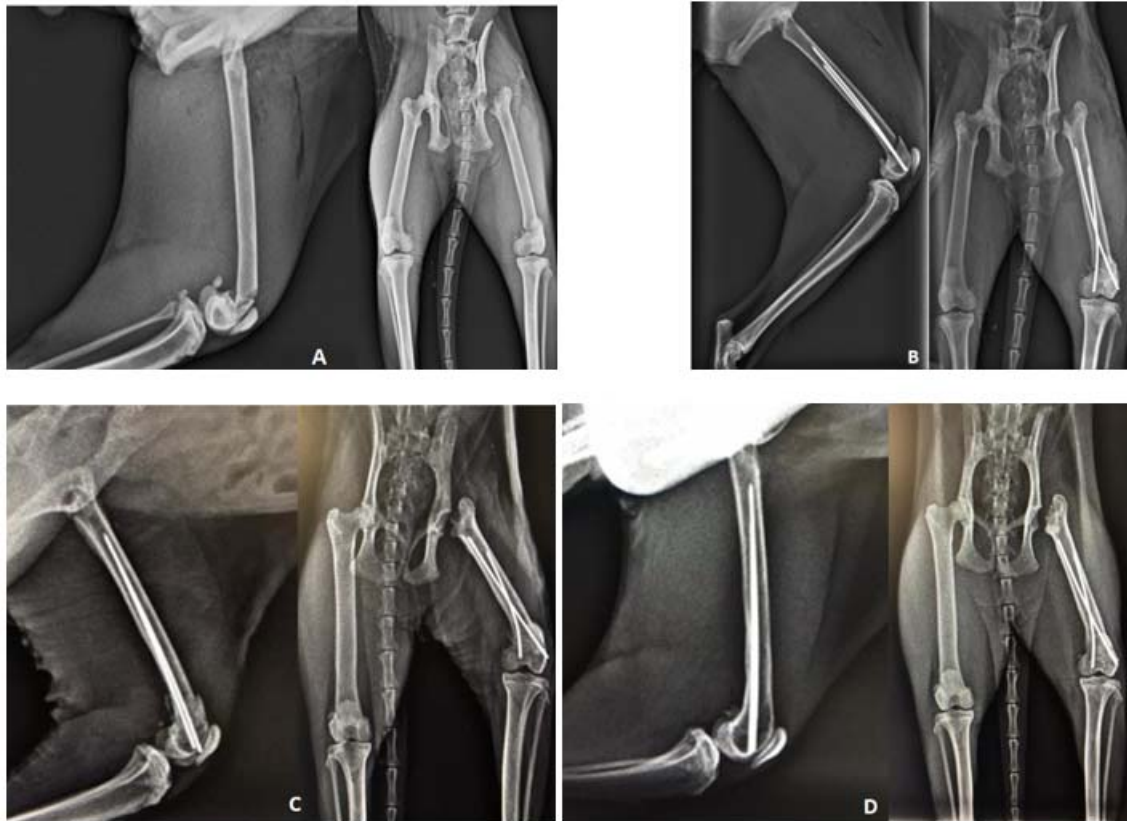
## Results

Dynamic intramedullary cross pinning technique was applied to treat supracondylar femur fractures in 12 cats in our study. Of the implanted cats, 8 are hybrid, 2 are angora cat, 1 is Russian blue, 1 is British shorthair. Of the patients, 4 were male, 8 were female, their average age was 13 months, and their weight range was 3.65 kilogram (kg). Of the patients, 10 fractures were caused by falling from a height, 1 by a traffic accident, and 1 by the pressure applied on them. Of the patients, Salter-Harris type I fractures were observed in 1, Salter-Harris type II fractures in 7, Salter-Harris type IV fractures in 3, and diaphyseal femur fractures in 1 patient. In addition to these fractures, 5 of the cats had pneumothorax, 1 had caput femoris fracture, 1 had a segmented diaphyseal femur fracture, and 1 had bilateral humerus condylar fracture. In the dynamic intramedullary crosspinning technique for supracondylar femur fractures, in 3 cases, 2 K-wires of 2mm thickness were used, in 7 cases, 2 K-wires of 1.5 mm thickness were used, and in 2 cases 2 K-wires of 1 mm thickness were used. In 3 cases with Salter-Harris type IV fractures, an intercondylar screw (2.0 mm) was placed to stabilize the condyles together with the K-wires. In eight cases, it was observed that they used their extremity after removing the bandage on the relevant extremity (2 weeks later). In two cases with Salter-Harris type IV fractures, apart from the supracondylar femur fracture, limping was observed due to fractures in other extremities (inability to bear weight). However, it was observed that he used his extremity after the healing of other fractures was completed. In a case with a Salter-Harris type IV fracture, narrowing and limping were observed in the joint angle due to damage to the joint caused by trauma. In a case with a Salter-Harris type I fracture, 5 days after the operation, it was observed that pin migration was formed because there was no restriction of movement area, and then it was treated with crosspinning application. Apart from this, no complications such as postoperative pin migration, pin, and screw breakage were encountered in any animal. On radiographic examinations made, it was determined that sufficient callus tissue was formed on the 35th and 40th days. In 10 of the patients, full recovery and return to normal extremity movements were achieved without complications (Figure 2). There was a delay in healing due to pin migration in 1 of the patients and the development of infection in the surgery area in 1 of the patients; however, after the use of antibiotics, the infection was suppressed, and recovery was observed (Table 1).

**Table 1.** Details and clinical outcomes of 12 cats postoperatively

Case no	Race	Age (Month)	Gender	Body weight (kg)	Fracture type	Cause of Trauma	Additional orthopedic injuries	Treatment method	Outcomes
1	Crossbreed	30	M	4	Salter-Harris Type IV	Falling from high	Fracture of humeral condylus (bilateral)	DICPT and ISA	Decrease range of motion and lameness
2	Crossbreed	24	F	3.5	Salter-Harris Tip II	Falling from high	Comminuted femoral shaft fracture (left hindlimb)	DICPT	Functional healing
3	Crossbreed	3	F	1.1	Salter-Harris Type II	Road traffic accident trauma	None	DICPT	Failure followup
4	Crossbreed	8	F	3.5	Salter-Harris Type II	Falling from high	Femoral shaft fracture (right hindlimb)	DICPT	Functional healing
5	Crossbreed	9	M	3.7	Salter-Harris Type II	Falling from high	None	DICPT	Functional healing
6	Russian Blue	3	F	1.2	Salter-Harris Type II	Falling from high	None	DICPT	Functional healing
7	Crossbreed	15	F	3.8	Salter-Harris Type II	Falling from high	None	DICPT	Failure follow up
8	British Shorthair	7	M	3.2	Salter-Harris Type IV	Falling from high	None	DICPT and ISA	Functional healing
9	Angora cat	24	M	4.6	Salter-Harris Type IV	Falling from high	None	DICPT and ISA	Functional healing
10	Angora cat	12	F	3.4	Salter-Harris Type II	Falling from high	Femoral head fracture	DICPT	Functional healing
11	Crossbreed	8	F	3,5	Diaphyseal Femur	Falling from high	Salter-Harris Type II	DICPT	Functional healing
12	Crossbreed	12	F	3,7	Salter- Harris Type I	Pressure induced fracture	None	DICPT	Pin migration

M: Male, F: Female, DICPT: Dinamic intramedullary cross pinning technique, ISA: Intercondular screw application



**Figure 2:** Craniocaudal and mediolateral radiographic views of femur fracture before (A), postoperatively (B), 2 weeks (C) and 2 months (D) after dynamic intramedullary cross pinning of femur fracture.

## Discussion

Plates, external fixators, rush pin, cross-pin and single or stack pin implementation of intramedullary (IM) pin are frequently used fixation methods in simple distal femur fractures in cats and dogs. Plate osteosynthesis and external fixator application are frequently preferred in distal femur fractures. Nevertheless, it is known that plate and external fixator application, which is one of these techniques, is disadvantageous compared to IM pin application in terms of time and cost (Altunatmaz, 2017; Beale, 2004). IM pins resist bending force but are very weak against rotation (Syam et al., 2012). Cross pins are significantly stronger than single IM pin applications (Sukhiani and Holmberg, 1997). Cross pins are indicated for simple transversal or short oblique fractures in cats and small dogs, and adult animals (Lidbetter and Glyde, 2000; Sukhiani and Holmberg, 1997). It is stated that cross-pin fixation of femoral supracondylar fractures, compared to single pin fixation, increases the stabilization of the fracture fragments by contacting the bone at more than one point, thus providing early fracture union (Aithal et al., 1998). Complications such as pin migration, osteomyelitis, instability, lameness,

nonunion, and malunion were reported in pin applications (Newton, 1985; Stigen, 1999). Lidbetter and Glyde (2000) stated that a supracondylar femur fracture predisposed the animal to soft tissue complications such as quadriceps contracture, resulting in stiff hyperextension of the affected leg and reduced flexion of the knee joint. In one study, the dynamic intramedullary cross pin technique was used in distal femur fractures of dogs, and it was reported that it provides good stability and recovery without any complications in the postoperative follow-up (Dn et al., 2014). Robinson (2000), as for that, applied rush pin in distal femur fractures of cats and reported complications such as postoperative pin migration and caudal metaphyseal proliferation. In the present study, a dynamic intramedullary crosspinning technique was used for distal femur fractures and Salter-Harris type 2 and 4 fractures of cats. In parallel with the studies conducted, postoperative Robert Jones bandages and area restrictions were applied to the animals. Pin migration complications reported in previous studies (Robinson, 2000; Stigen, 1999), occurred in one animal in our study. The reason for pin migration in this animal is thought to be related to the animal is a tough-tempered animal and does

not accept the postoperative bandage; animal owners do not narrow the area and release the animal in the postoperative period. Apart from this, no complications were encountered.

In one study conducted, it was reported that supracondylar femur fractures are mostly seen in animals aged 3-9 months (Gill et al., 2018). Robinson (2000) reported that cats with supracondylar femur fractures are adult cats in his study. It is seen that the animals included in the study are mostly between 3-10 months old, and this situation is compatible with the study of Gill et al. (2018). Considering that cats' growth plates close later than dogs (Smith, 1969), this is thought to be related to the fact that young or young adult animals are more mobile, and their growth plates are not yet closed.

Palmer et al. (1988), reported that normograde im pin application in femur fractures might be less likely to cause sciatic nerve injury, especially in midshaft and distal fractures, compared to retrograde application. During retrograde application, keeping the hip joint slightly extended and adduction of the leg minimizes soft tissue penetration and prevents the exposed pin from damaging the sciatic nerve (Deyoung and Probst, 1993). It is reported that there is no problem such as sciatic nerve damage in the dynamic intramedullary pin technique, and it gives good results in distal diaphysis fractures (Beale, 2004). In the present study, no neurological problems such as sciatic nerve damage were encountered in consequence of the dynamic intramedullary cross-pinning technique applied to distal femur fractures. Consequently, the dynamic intramedullary cross-pinning application is an easy, inexpensive, and reliable technique for feline supracondylar and distal diaphyseal femur fractures, and it is recommended to be used in the treatment of this type of fracture.

### Acknowledgment

This research article was summarized from Metehan Turan CEBECİ's MSc. thesis.

### References

- Aithal HP, Singh GR, Sharma AK, Amarpal, 1998: Modified technique of single pin fixation and cross intramedullary pin fixation technique for supracondylar femoral fracture in dogs: A comparative study. *Indian J. Vet. Surg*, 19(2): 84-89.
- Altunatmaz K, Karabagli M, Aydın Kaya D, et al., 2017: The treatment of supracondylar and diaphyseal femoral fractures in cats using intramedullary two-way stacked Kirschner wire application. *Turk J Vet Anim Sci*, 41: 282-287.
- Beale B, 2004: Orthopedic Clinical Techniques Femur Fracture Repair. *Clin Tech Small Anim Pract*, 19:134-150.
- Chandler JC, Beale BS, 2002: Feline orthopedics. *Clin Tech Small AnimPract*,17:(4), 190-203.
- Deyoung DJ, Probst CW, 1993: Methods of internal fracture fixation. (Ed.) Slatter D H. *Textbook of Small Animal Surgery*. 2nd edn, pp. 1610-27. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Dn M, Ahmad RA, Aithal HP, et al., 2014: Surgical management of supracondylar femur fracture in dog. *Indian J of Canine Pract*, 6 (2), 158-160.
- Fossum TW, 2013: Small Animal Surgery. 4th ed. Elsevier. Philadelphia, USA. pp: 1181-1185.
- Gill KK, Kumar A, Sangwan V, Anand A, Mahajan SK, Mohindroo J 2018: Comparative functional outcome of supracondylar femora lfracture stabilized with cross and end threaded intramedullary pinning in dogs. *Indian J Anim Sci*, 88(2): 161-169.
- Langley-Hobbs SJ, Carmichael S, McCartney W, 1996: Use of external fixators in the repair of femoral fractures in cats. *J Small Anim Pract*, 37; 95-101.
- Lidbetter DA, Glyde MR, 2000: Supracondylar femoral fractures in adult animals. *Comp. Cont Edu Pract Vet*, 22:1041-1045.
- Newton CD, 1985: Fractures of the femur. *Textbook of Small Animal Orthopaedics*. pp. 428-30. (Eds.) Newton C D and Nunamaker D M. Lippincott, Philadelphia.
- Palmer RH, Aron DN, Purinton PT, 1988. Relation ship off emoral intramedullary pin stothe sciatic nerve and gluteal muscles after retrograde and normogradeinsertion. *Veterinary Surgery*, 17: 65-70.
- Ramesh N, Anil M, Raghavender KBP, Gireesh Kumar V, Chandra Sekhar EL, Latha C, 2018: A clinical study on the use of single 'Arrow-pin' technique for management of supracondylar femoral fractures in young dogs. *J Entomol Zool Stud*, 6: 1047-1050
- Rathnadiwakara RWMH, De Silva DDN, Suranji Wijekoon HM, 2020: Treatment of supracondylar femoral fractures in young cats and dogs using "Arrow Pin" technique. *J Vet Med Animal Sci*, 3: 1017-1022.
- Robinson A, 2000: Use of a Rush pin to repair fractures of the distal femur in cats. *Veterinary Record*, 146, 429-432.
- Scotti S, Klein A, Pink J, Hidalgo A, Moissonnier P, Fayolle P, 2007: Retrograde placement of a novel 3.5 mm titanium interlocking nail for supracondylar and diaphyseal femoral fractures in cats. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 20; 211-218.
- Simpson DJ, Lewis DD, 2003: Fracture of the femur. In: Slatter D, editor. *Textbook of Small Animal Surgery*. 3rd ed. Philadelphia, PA, USA: WB Saunders Company; pp. 2059-2089.
- Smith RN, 1969: Fusion of ossification centres in thecat. *J Small Anim Pract*, 10, 523-530.
- Stigen O, 1999: Supracondylar femoral fractures in 159 dogs and cats treated using a normograde intramedullary pinning technique. *J Small Anim Pract*, 40: 519-523.

Sukhiani HR, Holmberg DL, 1997: Ex Vivo Biomechanical Comparison of Pin Fixation Techniques for Canine Distal Femoral Physeal Fractures. *Veterinary Surgery*, 26: 398-407.

Syam KV, Venkateswaralu B, SaradaAmmu T, Raji TA, Ranjith M, 2012: External skeletal fixation in combination with intramedullary pinning and cerclage wiring for the management of comminuted fracture of humerus in dog. *Indian J Canine Pract*,4: 54-55.

Worth AJ, 2007: Management of fractures of the long

bones of eight cats using external skeletal fixation and a tied-in intramedullary pin with a resin-acrylic bar. *NZ Vet J*, 55; 191- 197.

Zahn K, Matis U, 2004: The clamp rod internal fixator - application and results in 120 small animal fracture patients. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 17; 110-120.

**\*Correspondence:** Birkan KARSLI  
Kirikkale University, Faculty of Veterinary Medicine,  
Department of Surgery, Kirikkale, Turkey.  
**e-mail:** birkankarsli@gmail.com

## Identification of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR Method in Fish and Water Samples from Tigris River, Turkey

Filiz ÖZCAN<sup>1,a,\*</sup>, Neval Berrin ARSERİM<sup>2,b</sup>, Muzaffer Aydın KETANİ<sup>3,c</sup>

<sup>1</sup>Dicle University, Veterinary Faculty, Fisheries and Fisheries Diseases Department, Diyarbakır, Turkey .

<sup>2</sup>Dicle University, Veterinary Faculty, Department of Microbiology, Diyarbakır, Turkey.

<sup>3</sup>Dicle University, Veterinary Faculty, Department of Histology and Embryology, Diyarbakır, Turkey.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0003-4767-9893; <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-7097-0091; <sup>c</sup>ORCID:0000-0002-1546-9747

Geliş Tarihi: 13.10.2021

Kabul Tarihi: 02.12.2021

**Abstract:** Climate change has caused increasing *Vibrio parahaemolyticus* infections in areas unaffected by this pathogen. Water temperature is an important ecological factor. It is consequently of high importance to follow *V. parahaemolyticus* in aquatic environments and foods. The aim of this work was to detect the presence of *V. parahaemolyticus* in Tigris River from eight different sites namely Malabadi Bridge, Fiskaya, Ongözlü Bridge, Bağvar, Pamukçay, Ambarçay, Seyrantepe and Silvan. Total 480 samples of water and fish were used for *V. parahaemolyticus* detection. Thiosulphatecitrate-bile salt sucrose (TCBS) Agar was employed for bacteria isolation for 24 h at 37°C. The dominant uniform bacterial colonies were purified by streaking onto the TCBS agar plates three times. Identification of this pathogen was made by PCR. A total of 480 water and fish samples were analyzed. According to the results, *V. parahaemolyticus* was detected in 40 (6.6%) fish samples taken from the Seyrantepe region.

**Keywords:** Fish, PCR, *Vibrio parahaemolyticus*, Water.

### Dicle Nehrindeki Balık ve Su Örneklerinde *Vibrio parahaemolyticus*'un PCR Yöntemi ile İdentifikasyonu

**Özet:** İklim değişikliğinin bir sonucu olarak artan sayıda *Vibrio parahaemolyticus* enfeksiyonu tespit edilmiştir. Su sıcaklığı çok güçlü bir ekolojik faktördür. Dolayısıyla su ortamlarında ve su ürünlerinde *V. parahaemolyticus*'u takip etmek önem arz etmektedir. Bu çalışmanın amacı, Dicle nehrinde bulunan Malabadi Köprüsü, Fiskaya, Ongözlü Köprüsü, Bağvar, Pamukçay, Ambarçay, Seyrantepe ve Silvan olmak üzere sekiz farklı yerdeki *Vibrio parahaemolyticus*'un varlığını araştırmaktır. Bu amaçla toplam 480 su ve balık numunesi kullanılmıştır. Bakteri izolasyonu için örnekler Tiyosülfatsitrat-safra tuzu sukroz (TCBS) Agara ekim yapılmış, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir ve bakteri kolonileri, TCBS agar plakalarına üç kez sürme yoluyla saflaştırılmıştır. Patojenin kesin tespiti PCR testi ile gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın sonucunda Seyrantepe'deki 40 (6.6%) adet balık örneğinde patojenin varlığı tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Balık, PCR, Su, *Vibrio parahaemolyticus*.

## Introduction

Infections with *Vibrio* spp. have increased worldwide by ongoing climate change (Logar-Henderson et al., 2019) *Vibrio parahaemolyticus* is a Gram-negative bacterium that inhabits estuarine and marine waters and grows in various temperatures. The highest density of this organism occurs when the water temperature is 20–30°C (Givens et al., 2014). The organism is a human pathogen and can cause gastroenteritis and septicemia because of consuming a variety of raw sea food (Constantin de Magny et al., 2009). This disease is usually observed in immunocompromised individuals (Froelich and Daines 2020). The surface temperature of rivers and estuaries has increased more quickly due to climate change than that of oceans (EEA 2012) High surface temperature in water provides optimum environmental growth conditions for *Vibrio* species (Vezzulli et al., 2013)

The number of *Vibrio* cases has been found to rise in line with increased water surface temperature (Semenza et al., 2017). Water temperature is an essential part of chemical and biochemical processes in aquatic ecosystems. The Tigris River is one of the largest rivers in the Middle East and Diyarbakır is the greatest city and the largest urban place in the Tigris Basin in Turkey (Murib et al., 2017) It has been progressively developing through the southeastern Anatolia Project (GAP), and is one of the most important industry, agriculture and animal husbandry centers in the Tigris Basin. The Tigris River is an important water source for the city (Varol et al., 2010) Therefore, we felt the need to investigate of *Vibrio parahaemolyticus* of Tigris River in Diyarbakır. Accordingly, the present study was undertaken to identify *V. parahaemolyticus* and to assess.



## Material and Methods

**Sample Collection:** This study was conducted in Turkey on Diyarbakır. Four hundred and eighty water and fish samples were obtained from selected eight areas along the Tigris River in Diyarbakır. The analyzed fish species were *Cyprinion macrostomum*, *Alburnus mossulensis*, *Capoeta trutta*, *Capoeta umbla*, *Garra variabilis* and *Garra*

*rufa*. Fish weight was between 70 gr and 190 gr. Fish meat was analyzed. The water samples were collected from the water surface into sterile glass bottles. Fish samples were collected with a fishing net and transported to the laboratory in the ice box for analysis within two hours of collection. Laboratory work was conducted in the Department of Veterinary Medicine and Bioeks the STI R & D Technologies Ltd., Turkey.



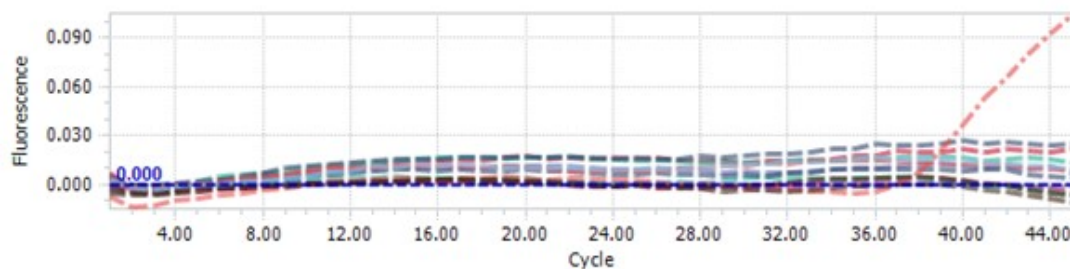
**Figure 1.** Eight sampled points in Tigris River.

RINA™ M14 for nucleic acid (NA) extraction from samples Nucleic Acid Isolation Kit (Cat No: RN-NA-14-120-192) and RINA™ M14 Nucleic Acid Extraction Robot (Cat No: RN-NA-302-100) (Bioeks the R & D Technologies Ltd. Sti., Turkey) were used. Fish meat samples were homogenized by vortexing with four different chemicals. The homogenate (550 µL) was loaded into the robot. The water samples (550 µL) were loaded directly into the robot. A robot was loaded molecular-scale water (550 µL) as a negative control. Bio-peedy® vibrioparaheolyticus Real-Time PCR Detection Kit (Cat No. BS-DTC-121-100) (Bioeks the STI R & D Technologies Ltd., Turkey) vecobas® TaqMan® 48 Analyzer (Roche Diagnostics, USA) were used. With COBAS® TaqMan® 48 Analyzer Software, threshold cycle numbers (Cq) were calculated and the shape of the propagation curves was examined. Non-sigmoidal curves were recorded as negative. Nucleic acid

extraction was successfully recorded for reactions with IC threshold cycle number  $Cq < 34$ .  $37 \leq Cq$  is negative; A positive result was recorded if  $Cq < 37$ . Samples that gave negative results in negative control reaction and positive results in *Vibrio parahaemolyticus* reaction were evaluated as *Vibrio parahaemolyticus* positive and the following results were obtained (THSK, 2019).

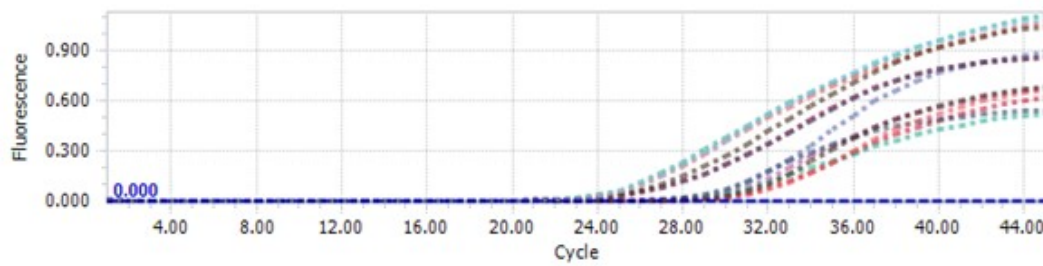
## Results

A Total of 480 water and fish samples were analyzed (Fig. 2,3) According to the results *V. parahaemolyticus* was detected in 40 (6.6. %) fish samples taken from the Seyrantepe region (Table 1). The upwardly increased sigmoidal curve seen in Fig. 2 showed the sample of fish taken from Seyrantepe. It was an indication that *V. parahaemolyticus* was found in this sample.



**Figure 2.** Growth curves were obtained from the tested samples. The sigmoidal curve show in the above graph yielded obtained from the Seyrantepe locality fish sample (40.92 Cq).





**Figure 3.** Internal control proliferation curves were obtained from the tested samples.

**Table 1.** Threshold cycle numbers (Cq) and test result of tested samples.

Sample	IC Cq	<i>V.parahaemolyticus</i> Cq	Extraction	<i>V.parahaemolyticus</i>
Negative Control	23.55	-	Successful	Negative
Ambarçay Water	25.46	-	Successful	Negative
Malabadi Bridge Water	24.86	-	Successful	Negative
Fiskaya Water	24.72	-	Successful	Negative
Fiskaya Fish	27.43	-	Successful	Negative
Pamukçay Water	25.13	-	Successful	Negative
Pamukçay Fish	26.14	-	Successful	Negative
Bağıvar Water	25.01	-	Successful	Negative
Bağıvar Fish	27.77	-	Successful	Negative
Silvan Water	25.08	-	Successful	Negative
Silvan Fish	26.93	-	Successful	Negative
Ongözlü Bridge Water	24.27	-	Successful	Negative
Ongözlü Bridge Fish	28.01	-	Successful	Negative
Seyrantepe Water	24.59	-	Successful	Negative
Seyrantepe Fish	27.75	40.92	UnSuccessful	Pozitive

## Discussion and Conclusion

*V. parahaemolyticus* is a natural inhabitant in estuarine and marine environments worldwide (Mok et al., 2019a). Over the years, the epidemic of *V. parahaemolyticus* infections has been a significant public health problem for the number of its infections has increased in many countries (Hemmat et al., 2018). It has been observed in Chile, the United States, Asia, Europe and Peru during the last decades. These epidemics were linked to gradual water temperature increases (Velazquez-Roman et al., 2014). Various studies have shown that environmental factors such as temperature, turbidity, amounts of organic matter, water salinity cause *V. parahaemolyticus* infections (Siddique et al., 2021). *V. parahaemolyticus* causes at minimum

30000 infections per year most of them are gastroenteritis (Xie et al., 2015). The highest densities of this organism occur when the water temperature is 20–30°C (DePaola et al., 2003). *V. parahaemolyticus*, widely dispersed in estuarial and coastal marine waters has been detected from water, sediment, and different species of fish (Federici et al., 2018). The present results showed that *V. parahaemolyticus* was detected in fish samples (6.6%) taken from the Seyrantepe region (Table 1, Figure 2). The water temperature in this area was 32°C. These results suggest that it is correlated to water temperature as reported by other researchers (Adesiyan et al., 2021). Hemmat et al. (2018) reported that *V. parahemolyticus* spp. isolated from the examined fish samples were 8% and 12% for freshwater and marine water fish respectively. Conversely, Sanjeev (2002) informed

that the rate of *V. parahaemolyticus* in fresh, marine and brackish water fish varied from 35 to 55%. Terentjeva et al. (2015), said that *Vibrio* species could be found on the skin, chitinous shell, gills, intestinal tracts, kidney, and liver of fish or shellfish. Besides, the resource of the contamination may be human feces or sewerage. Martin et al. (2004) stated that 24 % of catfish and 40 % of red tilapia samples were infected with *V. parahaemolyticus* in work from Malaysia (Noorlis et al., 2011). On the other hand, from water samples *V. parahaemolyticus* was detected in 15.6% (Guin et al., 2019). In the presented study, it was not detected in water samples. The reason for this may be salinity, stream, and depth. These water characteristics also vary temporally and spatially throughout the river. *V. parahaemolyticus* is positively connected with water temperature, negatively associated with water clarity (Kwit et al., 2019). For these reasons, it may not have been detected in water samples. Temperature, season, salinity, methods of identification, study area, source of samples and temperature during storage or even transportation may affect the existence of *V. parahaemolyticus*. Rivers are the most important freshwater resource for humans, plants and animals. Water is contaminated by industrial waste, sewerage, and human activities. These bacteria, which are closely related to human health, should be detected regularly. Ahmed et al. (2018) reported that from fresh water fish and human stool were detected in 5% and 3%. Many researchers have been studied to define the relationship between *V. parahaemolyticus* existence and environmental factors like temperature, dissolved oxygen, salinity and nutrients. Consequently, these water quality properties can be used in a predictive way to define when this pathogen may be present (Gayatri, 2011). In this study, the presence of *V. parahaemolyticus* was determined and its importance for public health was emphasized. In addition, it has been concluded that by carrying out these studies regularly, poisoning from these bacteria can be prevented, and the public should be informed.

### Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### Author Contributions

FÖ and NBA planned, designed the research. The manuscript was written by FÖ and NBA.

All authors have interpreted the data, revised the manuscript for contents, and approved the final version.

### References

- Ahmed HA, Abdelazim RS, Gharieb RMA, Abou Elez RMM, Awadallah, MAI 2018: Prevalence of antibiotic resistant *v. parahaemolyticus* and *v. cholerae* in fish and humans with special reference to virulotyping and genotyping of *V. Parahaemolyticus* *Slov Vet Res* 55 (Suppl 20): 251–62
- Adesiyani MI, Bisi-Johnson MA, Ogunfowokan A.O, Okoh AI 2021: Occurrence and antibiogram signatures of some *Vibrio* species recovered from selected rivers in South West Nigeria *Environmental Science and Pollution Research* 28:42458–42476
- Al-Murib M, Wells S, Talke SA 2017: Estimation of Surface Water Temperature of the Tigris River System in Iraq *World Environmental and Water Resources Congress*.
- Babai J, Kira R, Mohd Sinang F, Maurice Bilung L. 2020: Occurrences of *Vibrio parahaemolyticus* in Retailed Freshwater Fish *Trends in Undergraduate Research*, 3: a1-4.
- Constantin de Magny G, Long W, Brown C, Hood R, Huq A, Murtugudde R, Colwell R 2009: Predicting the distribution of *Vibrio* spp. in the Chesapeake Bay: a *Vibrio cholerae* case study. *Eco Health*, 6, 378–389.
- DePaola A, Nordstrom JL, Bowers JC, Wells J.G, Cook DW 2003: Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Appl Environ Microbiol* 69, 1521–1526.
- European Environmental Agency Climate Change, Impacts and Vulnerability in Europe Copenhagen, Denmark: European Environmental Agency, 2012.
- Federici S, Serrazanetti DI, Elisabetta Guerzoni M, Campana R, Ciandrini E, Baffone W, Gianotti, 2018: A. Development of a rapid PCR protocol to detect *Vibrio parahaemolyticus* in clams, *J Food Sci Technol*, 55(2):749–759 .
- Froelich BA, Daines DA 2020: In hot water: Effects of climate change on *Vibrio*–human interactions, *Environmental Microbiology*, 22(10), 4101–4111.
- Gayathri, V. 2011: The prevalence and public health significance of human pathogenic *Vibrio* species in Hawai'i's diverse tropical coastal water environments. Water Resources Research Centre, University of Hawaii,
- Guin S, Saravanan MA, Chowdhury G, Perumal Pazhani G, Ramamurthy T, Chandra SD. 2019: Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in diarrhoeal patients, fish and aquatic environments and their potential for inter-source transmission *Heliyon*, 5. e01743
- Givens CE, Bowers JC, DePaola A, Hollibaugh JT, Jones JL 2014: Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* – potential roles for fish, oyster, sediment and water. *Letters in Applied Microbiology*, 58, 503–510.

- Hemmat M Ibrahim, Reham A, Amin 1, Nesreen Z, Eleiwa Hanan R, Ghanaym M. 2018: Vibrio Species in Fish and Shell Fish, *Benha Veterinary Medical Journal*, vol. 34, no. 2: 246-254 .
- Kvit A, Davis B, Jacobs J, Curriero Adjusted FC 2019: Non-Euclidean cluster detection of *Vibrio parahaemolyticus* in the Chesapeake Bay, USA. *Geospatial Health*, 14:783 .
- Logar-Henderson C, Ling R, Tuite AR, Fisman DN 2019: Effects of large-scale oceanic phenomena on noncholera vibriosis incidence in the United States: implications for climate change. *Epidemiol Infect*, 147 (243).
- Martin B, Jofre A, Garrigo M, Hugas M, Aymerich T. 2004: Quantification of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages by MPN-PCR method. *Letters in Applied Microbiology*, 39: 290-295 .
- Mok JS, Ryu A, Kwon JY, Kim B, Park K 2019a: Distribution of vibrio species isolated from bivalves and bivalve culture environments along the gyeongnam coast in Korea: virulence and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Food Control* 106
- Sanjeev S 2002: Pathogenic halophilic Vibrios in seafoods. In: Quality Assurance in Seafood Processing, 252pp. T.S. Gopala Krishna Iyer, M.K. Kandoran, Mary Thomas P.T Mathew (Eds). Central Institute of Fisheries Technology and Society of Fisheries Technologists (India), Cochi.
- Semenza JC, Trinanés J, Lohr W, Sudre B, Löfdahl M, Martínez-Urtaza J, Nichols G, Rocklöv J 2017: Environmental Suitability of *Vibrio* Infections in a Warming Climate: An Early Warning System *Environmental Health Perspectives* ,508.
- Siddique AB, Moniruzzaman M, Ali S, Dewan MdN, Islam MR, Islam MdS, Amin MB, Mondal D, Parvez AK and Mahmud ZH 2021: Characterization of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Isolated From Fish Aquaculture of the Southwest Coastal Area of Bangladesh. *Front. Microbiol.* 12:635539.
- Terentjeva M, Eizenberga I, Novoslavskij A, Straziņa V, Valciņa O, Ošmjana J, Bērziņš A 2015: Bacterial microflora of freshwater fish originated from Usmas Lake in Latvia. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4 (1):74–77 .
- Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2019: Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı.
- Xie T, Wu Q, Xu X, Zhang J, Guo W, Schembri M. 2015: Prevalence and population analysis of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products from South China markets. *FEMS Microbiol Lett*, 362: fnv178.
- Velazquez-Roman J, León-Sicaños N, Hernandez-Díaz LD J, Canizalez-Roman A. 2014: Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 on the American continent. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:110.
- Varol M, Gökot B, Bekleyen A 2010: Assessment of Water Pollution in the Tigris River in Diyarbakır, *Turkey Water Practice & Technology* ,Vol 5 No 1.
- Vezzulli L, Colwell R R, Pruzzo C. 2013: Ocean warming and spread of pathogenic vibrios in the aquatic environment. *Microb Ecol*, 65(4):81725 PMID:23280498.

\*Correspondence: Filiz ÖZCAN

Dicle University, Veterinary Faculty, Fisheries and Fisheries Diseases Department, Diyarbakır, Turkey

e-mail: filiz.ozcan@dicle.edu.tr

## Surgical Management of Abortion in a Rat

Serdal KURT<sup>1,a,\*</sup>, Seçkin SALAR<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Dicle University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Diyarbakır, Turkey

<sup>2</sup>Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Ankara, Turkey

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-0191-3245, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0001-9303-6253

Geliş Tarihi: 29.11.2020

Kabul Tarihi: 05.01.2021

**Abstract:** The gestation period of rats is on average 21 to 23 days. Conceptus can be detected by ultrasonography after the 8-9th days of the pregnancy. The total number of fetuses per pregnancy is 1 to 20. In some cases, abortion occurs depending on many etiological factors, and it is the most common complication of pregnancy. The subject of the present case report was the surgical management of spontaneous abortion using inhalation anesthesia in a rat. The material of the case report was a female albino 2-year-old rat weighing about 450 gr. The rat was admitted with vaginal bleeding and abortion in to the clinic. In anamnesis, it was reported that a pup was stillborn about three hours ago and then no other pup was delivered. Furthermore, it was informed that there was ongoing vaginal bleeding since the last 4-5 hours. Upon physical examination and ultrasonography, the case was diagnosed as abortion. It was decided to intervene with the abortion by surgery. The rat was premedicated subcutaneously with atropine sulphate and general anesthesia was induced with isoflurane through inhalation. Then, celiotomy was performed at cauda umbilicus. In total, 13 non viable fetuses were removed from both uterine horns. Incision wounds were sutured and the rat was evenly awakened from anesthesia and discharged. In conclusion, surgical management of the abortion case using inhalation anesthesia was successfully performed on the rat.

**Keywords:** Abortion, Fetus, Rat, Surgery.

### Bir Sıçanda Abortusun Cerrahi Yönetimi

**Özet:** Sıçanlarda gebelik süresi ortalama 21 ila 23 gün arasındadır. Konseptus gebeliğin 8-9. günlerinden sonra ultrasonografi ile tespit edilebilir. Gebelik başına toplam fetüs sayısı 1 ile 20'dir. Bazı durumlarda, birçok nedene bağlı olarak abort meydana gelir ve gebeliğin en sık görülen komplikasyonudur. Bu olgu sunumunun konusu, bir sıçanda spontan abortusun inhalasyon anestezisi ile cerrahi yönetimidir. Olgu sunumunun materyali, 2 yaşında ve 450 gr ağırlığında dişi bir albino sıçandı. Sıçan vajinal kanama ve abort şikayeti ile kliniğe getirildi. Anamnezde, bir yavrunun yaklaşık üç saat önce ölü doğduğu ve ardından başka yavrunun doğmadığı bildirildi. Ayrıca son 4-5 saattir devam eden vajinal kanama olduğu bilgisi verildi. Fiziksel ve ultrasonografi muayenesinde olguya abortus tanısı kondu. Cerrahi müdahaleye karar verildi. Sıçana premedikasyon olarak deri altı yolla atropin sülfat uygulandı ve genel anestezi inhalasyon yoluyla izofluran ile indüklendi. Daha sonra göbek deliğinin gerisinden ensizyon yapıldı. Uterusun iki kornusundan toplam 13 ölü fetüs çıkarıldı. Ensizyon hattı dikildi ve sıçan anesteziden sorunsuz şekilde uyandırılarak taburcu edildi. Sonuç olarak, sıçanda abort olgusunun inhalasyon anestezisi ile cerrahi yönetimi başarıyla gerçekleştirildi.

**Anahtar sözcükler:** Abort, Cerrahi, Fetüs, Sıçan.

### Introduction

It is known that the gestation period of rats averages 21 to 23 days (Kazerooni et al., 2006). Pregnancy can be determined by abdominal palpation, nipple enlargement, mammary development, increased body weight in the second week of the pregnancy. Embryo can be detected by ultrasonography after the 9th days of the pregnancy (Ypsilantis et al., 2009). The total number of fetuses per pregnancy can be about 9 (1 to 20) (Bekyürek, 2002). Abortion occurs depending on many aetiological factors (He and Sun, 2018; Zhang et al., 2016) and is known to be the most common complication of pregnancy. It was reported that miscarriage could occur in one-fifth of all pregnancies (Barrington et al., 1996). Abortion is a

situation that should be treated. The aim of this study was the surgical management of spontaneous abortion using inhalation anesthesia in a rat.

### Case History

The material of the case report was a 2-year-old female albino rat weighing about 450 gr. The rat was admitted with vaginal bleeding and abortion to Clinic of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Turkey. In anamnesis of the rat owner, it was reported that a pup was stillborn about three hours ago and then no other pup was delivered. Furthermore, it was

informed that there was ongoing vaginal bleeding for the last 4-5 hours. Upon physical examination of the rat, it was found that its pulse and respiratory rates were high and rectal temperature was low. Additionally, vaginal discharge and bleeding were detected. And then, transabdominal ultrasonography was performed to determine if there were other pups unborn in the uterus. Thus, unborn pups were found. Heartbeats, however, could not be determined in any of them. It was thought that all the pups dead. The case was diagnosed as abortion according to findings obtained from examination and anamnesis. After these procedures, it was decided to intervene with the abortion by surgery. First, the mid-ventral region of abdomen was prepared for operation. The rat was premedicated subcutaneously with atropine sulphate (0.045 mg/kg body weight). General anesthesia was induced with isoflurane through inhalation without pre-anesthesia. Moreover, anesthesia was performed with a mask without intubation (Figure 1).



**Figure 1.** Uterus horns exteriorized from abdominal cavity and exanimate pups.

For this purpose, 0.3-liter oxygen and isoflurane as much as 3% of oxygen per minute was performed. After providing general anesthesia, an approximately 2 cm long celiotomy was performed

in the cauda umbilicus. And then, the left and right uterine horns were identified and were exteriorized from the abdominal cavity. An incision was performed to the right horn near bifurcation of the uterine. Subsequently, a total of 13 exanimate pups were removed from both uterine horns (Figure 1). The uterine was sutured with the utrecht method and incisions of skin and muscles were closed by simple single suture. The surgical wound was managed with povidone iodine without a bandage. The rat was evenly awakened from anesthesia and discharged alive and well.

## Conclusion and Discussion

The case was diagnosed as abortion because pups weren't completely developed. The animal owner's anamnesis also confirmed this diagnose, as normal delivery time would be 3-4 days later. So, the abortion occurred on the 18th day after mating. But, the cause of abort was unknown. Causes of abortion generally are things such as chromosomal abnormalities, immune responses (He and Sun, 2018), disruption of the neuroendocrine mechanism (Narotsky et al., 2000), malnutrition or any diseases (Barrington et al., 1996) and levels of some hormones (Zhang et al., 2016). The cause of abortion was not investigated in this case report. Inhalation anesthesia was chosen for the surgery because it has the adjustable anesthesia depth and concentration. Due to this reason it safer than injectable anesthetics (Brunson, 1997). There were no complications during and after the operation. In conclusion, no similar research reported could be found, but surgical management was successfully performed in this abortion case. We think that periodic follow-up of the pregnancy process in rats would be beneficial for the health of the fetuses and the mother, and inhalation anesthesia can be used safely in cases requiring surgical intervention in the delivery process.

## Acknowledgements

This article was presented as abstract (online oral presentation) in 4th International Health sciences Conference (IHSC 2020), 5-6 November 2020, Diyarbakır, Turkey.

## References

- Barrington JW, Lindsay P, James D, Smith S, Roberts A, 1996: Selenium deficiency and miscarriage: a possible link? *Bjog*, 103 (2), 130-132.
- Bekyürek T, 2002: Laboratuvar hayvanlarında üreme sorunları, In: Evcil hayvanlarda doğum ve

- İnfertilite, Alaçam E (Ed), 355-382, Medisan Yayınları, Ankara.
- Brunson DB, 1997: Pharmacology of inhalation anesthetics, In: Anesthesia and analgesia in laboratory animals, Kohn DF, Wixson SK, White WJ, Benson GJ (Ed), 29-40, Academic press, London.
- He Y, Sun Q, 2018: IFN- $\gamma$  induces upregulation of TNF- $\alpha$ , downregulation of MMP-2 and MMP-9 expressions in abortion rat. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22 (15), 4762-4767.
- Kazerooni T, Mousavizadeh K, Abdollahee A, Sarkarian M, Sattar A, 2006: Abortifacient effect of Prangos ferulacia on pregnant rats. *Contraception*, 73 (5), 554-556.
- Narotsky MG, Best DS, Guidici DL, Cooper RL, 2000: Strain comparisons of atrazine-induced pregnancy loss in the rat 1. *Reprod Toxicol*, 15 (1), 61-69.
- Ypsilantis P, Deftereos S, Prassopoulos P, Simopoulos C, 2009: Ultrasonographic diagnosis of pregnancy in rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 48 (6), 734-739.
- Zhang Y, Yan W, Ge PF, Li Y, Ye Q, 2016: Study on prevention effect of zishen
- \*Correspondence:** Serdal KURT  
Dicle University, Faculty of Veterinary Medicine,  
Department of Obstetrics and Gynecology,  
Diyarbakır, Turkey.  
**e-mail:** serdal.kurt@hotmail.com

## Bir Bağdat Güvercininde Dev Hücreli Osteosarkom Olgusu: Türkiye’de İlk Kayıt

Ünal YAVUZ<sup>1,a</sup>, Ali HAYAT<sup>1,b</sup>, Kerem YENER<sup>1,c,\*</sup>, Nihat YUMUŞAK<sup>2,d</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-4981-2355, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-8597-0705, <sup>c</sup>ORCID: 0000-0002-6947-0356,

<sup>d</sup>ORCID: 0000-0002-9299-2902

Geliş Tarihi: 29.06.2021

Kabul Tarihi:11.10.2021

**Özet:** Olgumuzu kliniğimize sağ ayakta topallık ve tibiotarsus bölgesinde şişlik şikâyeti ile getirilen 2-3 yaşlarında, Bağdat güvercini oluşturdu. Radyografik muayenede sağ tibio-tarsus bölgesinde şiddetli yumuşak doku üremeleri ve kemik dokuda lizis gözlemlendi. Yapılan klinik ve radyolojik muayeneler sonucunda sağ ekstremitenin amputasyonuna karar verildi. Operasyon, genel anestezi altında femoro-tibial eklemin yaklaşık 5 mm proksimalinden gerçekleştirildi. Histopatolojik inceleme için gönderilen materyalde makroskopik olarak, sağ ekstremitenin tibio-tarsus bölgesinde yaklaşık 3x2 cm çapında, elastik, yer yer sert kıvamlı üremeler belirlendi. Deri yüzeyi ülseratif ve nekrotik manzaradaydı. Kitlenin kesit yüzü gri-beyaz renkte olup, yer yer kanamalı ve nekrotik görünümdeydi. Mikroskopik muayenede ise yoğun vasküler stromayla çevrelenmiş alanlarda yüksek reaktif kemik dokusu görüldü. Yapılan değerlendirmeler sonucunda olguya dev hücreli osteosarkom tanısı konuldu. Bu olgu sunumu ile bir Bağdat güvercininde ortaya çıkan dev hücreli osteosarkomun klinik, radyolojik ve histopatolojik özellikleri hakkında literatüre katkı sağlamak amaçlandı.

**Anahtar Kelimeler;** Dev hücreli osteosarkom, Güvercin, Tümör.

### The Case of Giant Cell Osteosarcoma in a Baghdad Pigeon: First Record in Turkey

**Abstract:** Our case was a 2-3- year-old Baghdad pigeon brought to our clinic with complaints of lameness in the right foot and swelling in the tibiotarsus region. The radiographic examination showed severe soft tissue growths, and lysis in the bone tissue were observed in the right tibio-tarsus region. As a result of clinical and radiological examinations, it was decided to amputate the right extremity. The operation was performed under general anesthesia from approximately 5 mm proximal to the femuro-tibia joint. In the material sent for histopathological examination, growths of approximately 3x2 cm in diameter, with elastic and hard consistency, were determined in the tibio-tarsus region of the right extremity. The skin surface was ulcerative and necrotic. The cross-sectional surface of the mass was gray-white and had a hemorrhagic and necrotic appearance. Microscopic examination revealed highly reactive bone tissue in areas surrounded by dense vascular stroma. As a result of the evaluations, the patient was diagnosed with giant cell osteosarcoma. This case report aimed to contribute to the literature about the clinical, radiological, and histopathological features of giant cell osteosarcoma in a Baghdad pigeon.

**Keywords:** Giant cell osteosarcoma, Pigeon, Tumor.

### Giriş

Osteosarkomlar, tümör hücrelerinin sağlıklı kemik hücrelerinden farklı olarak olgunlaşmamış osteoid adı verilen kemik yapıları üretmeleriyle ortaya çıkan ve nadir görülen kötü huylu primer kemik tümörleridir (Cavalcanti ve ark., 2004; Mallick ve ark., 2020). Etiyolojileri hala bilinmeyen bu tümörlerin lokal agresif ve kemik dokuyu yıkılayıcı özellikleri vardır (Sapierzyński ve ark., 2017). Evcil hayvanlarda osteosarkomlar, matriks görünümüne göre osteoblastik, kondroblastik, fibroblastik, teleangiektatik ve dev hücre tipleri olarak sınıflandırılabilen heterojen tümörlerdir (Farjanikish ve ark., 2018; Oryan ve ark., 2015). Dev hücreli osteosarkom, lezyonlu bölgedeki kanamalı ve damarlı alanlarda osteoklastik özellikte dev hücreler bulunduran, tüm osteosarkom olguları arasında insidansı %3 olan nadir bir osteosarkom

türüdür ve ilk kez 1986 yılında Bathurst ve arkadaşları tarafından bir insanda rapor edilmiştir (Mallick ve ark., 2020; Mikaelian ve ark., 1998; Oryan ve ark., 2015). Dev hücreli osteosarkomlar veteriner literatüründe çok nadir görülen bir osteosarkom alt tipidir. Evcil hayvanlarda daha çok kedi ve köpeklerde; tibia, femur, ulna, radius ve humerusta bildirilmiştir (Amann ve ark., 2007).

Veteriner hekimlikte, kanatlı hayvanlarda açıklanan vaka sayısının az olması nedeniyle dev hücreli osteosarkomun klinik ve patolojik yönleri hakkında bilgi yetersizdir. Bu olguda bir Bağdat güvercinin de rastlanan dev hücreli osteosarkomun klinik, radyolojik ve histopatolojik görünümleri hakkında bilgilendirme amaçlandı.



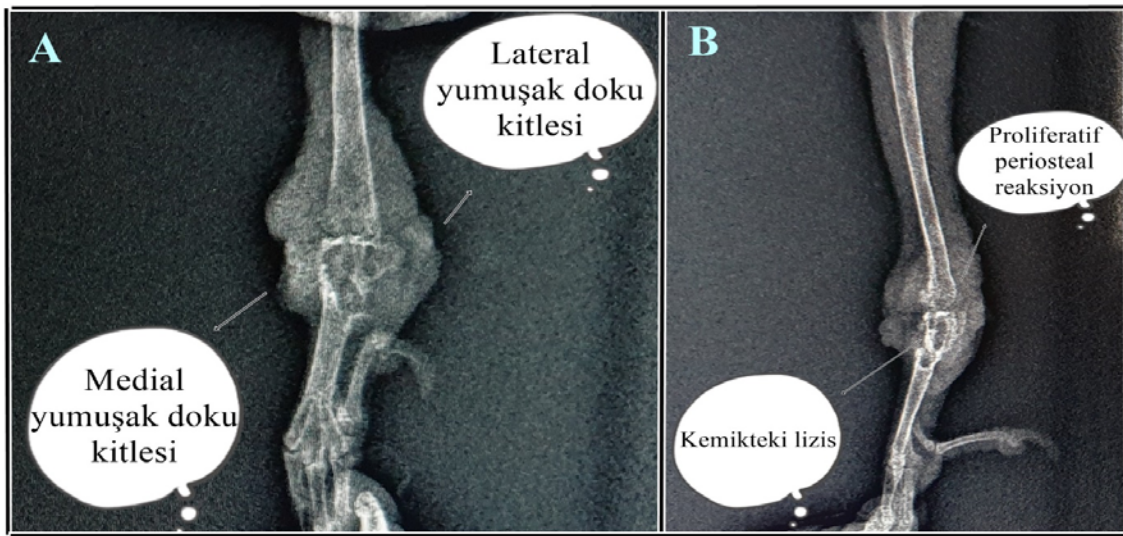
## Olgunun Sunumu

Bu vaka takdiminin konusunu, Harran Üniversitesi Hayvan Hastanesi Cerrahi Kliniği'ne getirilen, tahmini 2-3 yaşlarında erkek bir güvercin oluşturdu. Hayvan sahibinden alınan anemnezde, güvercinin sağ bacağına topallık ve eklem bölgesinde şişlik bilgisi alındı. Yapılan klinik muayenede ilgili ekstremitenin tibiotarsal eklem bölgesinde lokal sert bir şişlik ve ağrı olduğu saptandı (Şekil 1).

Yapılan radyografik muayene sonucunda sağ tibiotarsusunda proliferatif bir periosteal reaksiyon ile şiddetli kemik erimesi görüldü. Ayrıca medial ve lateral yumuşak doku kitlesi mevcuttu (Şekil 2A, B).



Şekil 1. Osteosarkomun klinik görüntüsü.



Şekil 2. Osteosarkomun dorsopalmar pozisyonundaki radyografik bulguları (A). Osteosarkomun mediolateral pozisyonundaki radyografik bulguları (B).

Bu sonuçlar değerlendirildikten sonra, ekstremitenin amputasyonuna karar verildi. Bu amaçla güvercinine 35 mg/kg dozda ketamin hidroklorür (Ketasol %10, İnterhas, Ankara, Türkiye) uygulandı. Bölgenin operasyon için uygun şekilde tıraş ve dezenfeksiyonu yapıldı. Orosz ve ark. (1992) tarafından yayınlanan protokole göre femura lateralden bir yaklaşım yapıldı. Bölgedeki kaslar, ligamentler ve damarlar tibiotarsusun vücuttan ayrılmasını sağlamak için kesilerek ligatür uygulandı. Femur distalinin yaklaşık 5 mm proksimalinden amputasyon gerçekleştirildi. Bölgesel kaslara femuru kapatacak şekilde 5/0 PGA iplik kullanılarak basit sürekli dikiş uygulandıktan sonra, deri 5/0 ipek iplik ile basit ayrı dikişlerle kapatıldı. Operasyondan sonraki tedavide ağrı kesici meloksikam (Bavet Meloxicam, Tuzla/İstanbul) 0.3 mg/kg ve antibiyotik içeren oral toz (Vitaform, Vetaş, Türkiye) 0.6-0.8 g/kg dozunda, 7 gün kullanıldı. Dikişleri 10 gün sonra alındı ve amputasyon alanının ve genel durumunun gayet iyi olduğu gözlemlendi. Patoloji

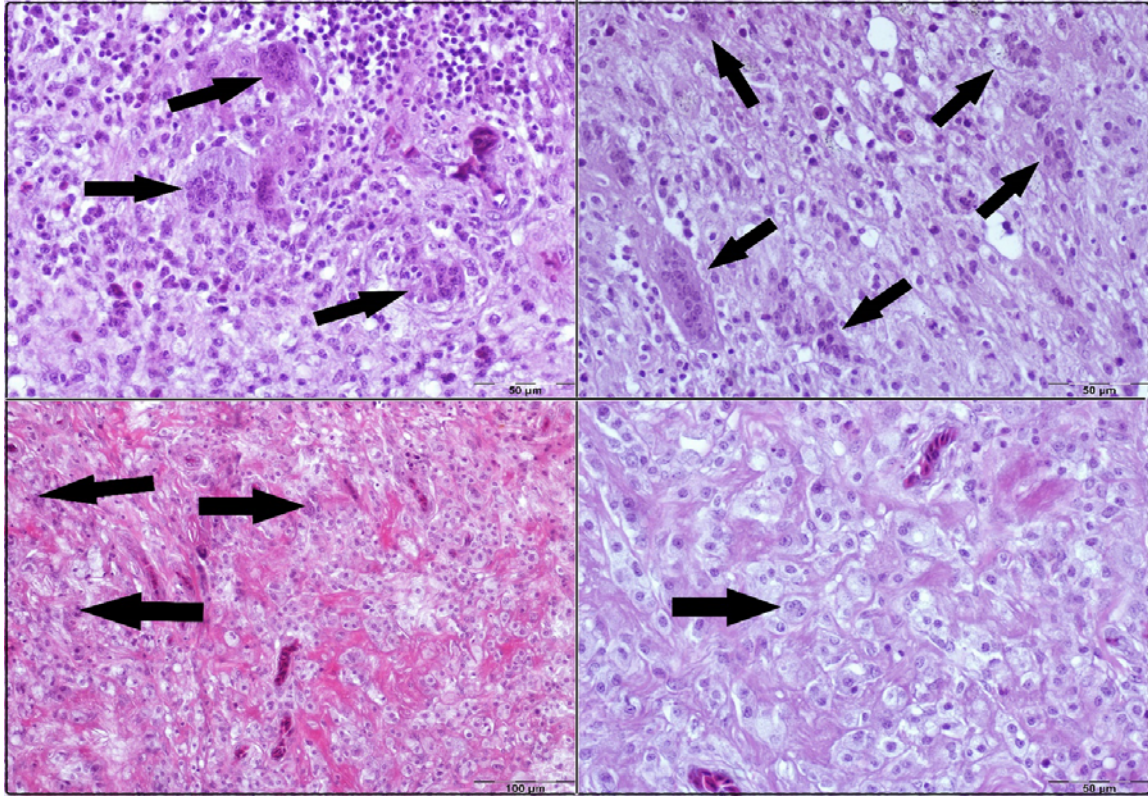
sonucunun bilgisi hasta sahiplerine iletildi ve olgunun süreci hakkında bilgi verildi. Hasta takibi sonucunda amputasyondan 47 gün sonra güvercinin öldüğü bilgisine ulaşıldı. Hasta sahibinden alınan bilgiler doğrultusunda ölmeden 2 gün önce güvercinde sürekli tek ayağını kullandığı için hareket alanında zorlanmaların arttığı, iştahsızlık ve halsizlik gözlemlendiği bilgisi alındı.

Ampute edilen ekstremitte histopatolojik inceleme amacıyla formalin içerisinde patoloji laboratuvarına gönderildi. Kitlenin histopatolojik incelemesinde alınan dokulardan hazırlanan kesitler hematoksilin-eozin ile boyandı. Gönderilen materyalde makroskopik olarak, sağ ekstremitenin tibiotarsus bölgesinde yaklaşık 3x2 cm çapında, elastik yer yer sert kıvamlı, yüzeyi ülseratif ve nekrotik manzaradaydı. Kesit yüzü gri-beyaz renkte olup, yer yer kanamalı ve nekrotik görünümdeydi. Geniş alanlar şeklinde fibröz yumuşak dokuya invaze kemik dokusuyla karşılaşıldı. Mikroskopik bulguları ise yoğun vasküler stromayla çevrelenmiş alanlarda



yüksek reaktif kemik dokusu görüldü. Bu alanlarda çok sayıda geniş sitoplazmalı ve çok çekirdekli (20-30) osteoklast benzeri dev hücreleri dikkati çekti. Ayrıca geniş alanlarda neoplazik özellikler gösteren ve çok sayıda atipik mitotik aktivitenin olduğu

osteoklastik hücrelerin varlığı gözlemlendi (Şekil 3). Bu alanlarda kanama alanları ile hemosiderin pigmentleri ve makrofajlardan oluşan yangısal hücreler görüldü. Bu doğrultuda dev hücreli osteosarkom olarak tanımlandı.



Şekil 3. Çok sayıda osteoklastik dev hücresi (oklar). HxE.

### Tartışma

Dev hücreli osteosarkomun insanlarda genç yaşlarda, köpeklerde ise ergin yaşlarda ortaya çıktığı bildirilmiştir (Amann ve ark., 2007). Ayrıca kedi, köpek ve ratlarda yapılan çalışmalarda daha çok erkek hayvanlarda ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Mikaelian ve ark., 1998). Bu olgumuzda ise; dev hücreli osteosarkom genç yaşlardaki, erkek Bağdat güvercininde tespit edilmiştir.

Dev hücreli osteosarkomun klinik bulguları spesifik olmamasına rağmen genellikle bölgede küçük bir şişlik ile başlayan, ağrı ve genel durum bozukluğuyla karakterize lokal agresif kemik yıkımlayıcı tümörlerdir (Cowan ve Singh, 2013; Wülling ve ark., 2003). Bu tümörlerde kısa sürede bölgesel şişliğin arttığı ve aşırı agresif bir hale geldiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Mallick ve ark., 2020). Benzer bir durum bu olguda da karşılaşılmış olup, eklem bölgesindeki şişlik kısa sürede artmıştır.

Osteosarkom, kanatlı hayvanlarda en sık apendiküler iskelet kemiklerinde görülmektedir. Uzun kemiklerin proksimal ve distal kısımlarında

lokalize olarak radius, humerus, femur, tibiotarsus, ve tarsometatarsusta rapor edilmiştir (Cavalcanti ve ark., 2004; Lamb ve ark., 2014). Kuşlarda osteosarkomun tespit edildiği diğer yerler, mandibula, orbita ve intraoküler bölgedir (Reavill, 2004). Bu olguda ise yapılan genel muayene ve radyografik muayene doğrultusunda hayvanda sadece tibiatarus kemiğinin etkilendiği gözlemlenmiştir.

Kanatlı hayvanlarda osteosarkom olgularında yapılan radyografik muayeneler hakkında yeterli veri bulunmamaktadır (Lightfoot, 2006). Bazı vakalarda tarif edilen lezyonlar arasında radyografik bulgu olmaması, bazılarında hafif periosteal reaksiyon bulunması, bazılarında ise kemik proliferasyonu ve kemik erimesi gibi bulgular bildirilmiştir (Fordham ve ark., 2010; Mayer ve ark., 2009). Karsinomlar, evcil ve çiftlik hayvanlarının en yaygın tümörlerinden olup tedavisinde radikal cerrahi genel ilkeler uygulanmaktadır (Yavuz ve Yumuşak, 2017). Bu çalışmamızda da Bağdat güvercininde radyografik olarak proliferatif periosteal reaksiyon ile kemik erimesi tespit ettiğimiz için

radikal cerrahi teknik olarak amputasyon tercih edilmiştir.

Dev hücreli osteosarkomlar, Enneking sınıflama sistemine göre: 1. evre, biyolojik olarak stabil olan gizli bir lezyon; 2. evre, kemik ile sınırlı, aktif, yavaş büyüyen bir lezyon ve 3. evre, lokal olarak agresif ve yumuşak doku uzantısı içeren lezyon şeklindedir (Amann ve ark., 2007). Bu olguda radyografik bulgularına dayanarak tibiotarsusta yıkım bulunmaktaydı ve kemikte metafiz veya epifizin anatomik yapısını saptamak zordu. Bu doğrultuda olgu Enneking'in sınıflandırmasına göre 3. evre lezyon olarak kabul edilebilir.

Kuş türlerinde ortaya çıkan osteosarkom raporları arasında muhabbet kuşları (*Melopsittacus undulatus*), şemsiye kakadu ve gül göğüslü kakadu (*eolophus roseicapilla*), mavi ve altın amerika papağanı (ara ararauna), amerikan robin (*turdus migratorius*), mavi kafalı papağan, toulouse gri kazı ve Panama tekne gagalı balıkçıl bulunmaktadır (Lamb ve ark., 2014). Bu vaka sunumu, literatürler doğrultusunda Bağdat güvercininde gözlenen dev hücreli osteosarkomun ilk raporudur.

Histopatolojik olarak dev hücreli osteosarkom, lezyonlu bölgelerdeki hemorajik ve perivasküler alanlarda çok sayıda osteoclast tipi dev hücre bulduran, osteoid sayısı az olan farklılaşmamış bir sarkomdur (Mallick ve ark., 2020). Dev hücreli osteosarkomlar, benign ve malign karakterde olan dev hücre tümörleri ile karışabilmektedir (Cowan ve Singh, 2013). Bu olgunun histopatolojik incelenmesinde lezyonlu alanlarda kanama alanları ile hemosiderin pigmentleri ve makrofajlardan oluşan yangısal hücreler ile çok çekirdekli (20-30) osteoclast-like dev hücreler ve geniş alanlarda neoplazik özellikler gösteren çok sayıda atipik mitotik aktivitenin olduğu osteoclastik hücrelerin varlığı dev hücreli osteosarkom varlığını kesinleştirmiştir. Dev hücreli osteosarkomun, dev hücre tümörlerinden ayırt edilmesi lezyonların farklı tedavi uygulamaları ve prognozu nedeniyle çok önemlidir.

Veteriner hekimlikte, kanatlı hayvanlarda dev hücreli osteosarkom ile ilgili açıklanan vaka sayısı oldukça sınırlıdır. Kanatlı türlerindeki raporların azlığı nedeniyle bu olgu sunumu ile bir Bağdat güvercininde dev hücreli osteosarkomun ortaya çıkabildiği görülen lezyonun klinik, radyolojik ve histopatolojik özellikleri hakkında literatüre katkı sağlamak amaçlanmış olup birçok sorunun yanıtlanması ve bu neoplazmin kanatlı hayvanlarda daha anlaşılır olabilmesi için daha fazla literatüre ihtiyaç olduğu görüşündeyiz.

## Kaynaklar

- Amann O, Meij BP, Westerhof I, Kik M, Lumeij JT, Schoemaker NJ, 2007: Giant Cell Tumor of the Bone in a Scarlet Macaw (*Ara macao*). *Avian Dis*, 51 (1), 146-149.
- Cavalcanti JN, Amstalden EMI, Guerra JL, Magna LC, 2004: Osteosarcoma in dogs: clinical-morphological study and prognostic correlation. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 41 (5), 299-305.
- Cowan RW, Singh G (2013): Giant cell tumor of bone: A basic science perspective In: *Bone*, 52, 238-246.
- Farjanikish G, Dezfoulan O, Mohammadi H, 2018: Metastatic giant cell osteosarcoma in a cat. *Vet Res Forum*, 9 (3), 289 – 292.
- Fordham M, Rosenthal K, Durham A, Duda L, Komaromy AM, 2010: Intraocular osteosarcoma in an umbrella cockatoo (*Cacatua alba*). *Vet Ophthalmol*, 13(Suppl), 103-108.
- Lamb S, Reavill D, Wojcieszyn J, Sitinas N, 2014: Osteosarcoma of the Tibiotarsus With Possible Pulmonary Metastasis in a Ringnecked Dove (*Streptopelia risoria*). *J Avian Med Surg*, 28 (1), 50-56.
- Lightfoot TL, 2006: Overview of tumors: Section I. In: Harrison GJ, Lightfoot TL. Edition, *Clinical Avian Medicine*, Vol II. Palm Beach, FL: Spix, 560-565.
- Mallick A, Shah N, Abdul Mahmud S K, Das SK, 2020: Giant cell-rich osteosarcoma – A rare case. *J Oral Maxillofac Pathol*, 24 (1), 67-72.
- Mayer J, DeCubellis J, Rau S, Barber L, 2009: Management of osteosarcoma in a grey goose. *Proc Annu Conf Assoc Avian Vet*, 335.
- Mikaelian I, Martineau-Doize' B, Martineau D, 1998: Giant-cell osteosarcoma in a female ranch mink (*Mustela vison*). *J Vet Diagn Invest*, 10, 301-302.
- Orosz SE, Ensley PK, Haynes CJ (1992). Surgical approaches to the pelvic limb. In: *Avian Surgical Anatomy-Thoracic and Pelvic Limbs*. Edition, Philadelphia, PA: WB Saunders, 99-109.
- Oryan A, Sadoughifar R, Shirian S, Kish FG, Daneshbod Y, 2015: Giant cell-rich osteosarcoma of tibia in a dog: a pathological and immunohistochemical study. *Comp Clin Pathol*, 24, 177-179.
- Reavill DR, 2004: Tumors of pet birds. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 7(3), 537-560.
- Sapierzyński R, Czopowicz M, 2017: The animal-dependent risk factors in canine osteosarcomas. *Po J Vet Sci*, 20(2), 293-298.
- Wülling M, Delling G, Kaiser E, 2003: The origin of the neoplastic stromal cell in giant cell tumor of bone. *Hum Pathol*, 34 (10), 983-993.
- Yavuz Ü, Yumuşak N, 2017: Sığırlarda Oküler ve Perioküler Tümörlerin Klinik ve Histopatolojik Değerlendirilmesi, *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 6 (1), 73-78.

\*Yazışma Adresi: Kerem Yener

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

e-mail: keremyener@harran.edu.tr

## Veteriner Hekimlikte OTC İlaçlar

Erdem GÜLERSOY<sup>1,a,\*</sup>, Canberk BALIKÇI<sup>1,b</sup>, Mutlu SEVİNÇ<sup>2,c</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Eyyübiye, Şanlıurfa, Türkiye

<sup>2</sup>Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Selçuklu, Konya, Türkiye

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0001-8511-0150, <sup>b</sup>ORCID: 0000-0001-7473-5163, <sup>c</sup>ORCID: 0000-0002-9805-5194

Geliş Tarihi: 31.03.2021

Kabul Tarihi: 09.10.2021

**Özet:** Pet hayvanı hekimliğinde potansiyel olarak toksik olan ve kullanımı günden güne artan çok sayıda tezgah üstü (Over the counter / OTC) ilaç bulunmaktadır. OTC grubu ilaçların çoğu, piyasada yaygın olarak bulunan, ucuz ve hekim kontrolü olmadan reçetesiz satın alınabilen ilaçlardır. Bu ilaçlar, veteriner hekimlikte hekim kontrolü dışında hasta sahibi tarafından satın alındığında kafa karışıklığına veya telaffuz hatalarına bağlı olarak yapılan terapötik yanlışlıkların yanı sıra beşeri hekimlikte suistimal veya intihar amaçlı da kullanılabilir. Çocuklarda ve ev hayvanlarında OTC ilaç zehirlenmeleri, kazara yutma veya bakıcının gözetimi dışında ilaca maruz kalma sonucu gelişmektedir. Günümüzde hem veteriner hekimliğinde hem de beşeri hekimlikte OTC grubu ilaçların kasıtlı yanlış kullanımı halen önemini korumaktadır. Bu sebeple ev hayvanlarının, özellikle kedi ve köpeklerin, ölümle sonuçlanabilen OTC grubu ilaç intoksikasyonlarına maruz kalmasının önüne geçmek ve tekrar oluşumunu önlemek için gerekli önlemler alınmalı; bakıcılar, yetiştiriciler ve hayvan sahipleri bu konuda bilgilendirilmelidir. Bu derlemede yaygın kullanılan ve kolay erişilebilen aspirin, ibuprofen, asetaminofen gibi non steroid antiinflamatuarlar, H2 reseptör antagonistleri, proton pompa inhibitörleri gibi gastrik protektanlar, ipekak şurubu gibi emetikerler, difenhidramin, loratidin gibi antihistaminikler ve dekonjestanlar, göz damlaları, vitaminler, laksatifler, anti diyaretikler ile anti tüssifler gibi OTC grubu ilaçların toksisiteleri, yanlış kullanımı sonucu ortaya çıkan klinik sonuçları ve bu ilaçlarla intoksikasyona sebep olabilen çevresel risk faktörleri ile birlikte bu ilaçlara maruz kalma durumunda uygulanabilecek tedavi seçenekleri incelenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *İntoksikasyon, Kedi, Köpek, OTC ilaç, Reçetesiz ilaç, Semptom.*

### OTC Drugs in Veterinary Medicine

**Abstract:** There are many over-the-counter (OTC) drugs in pet medicine that are potentially toxic and their use is increasing day by day. Most OTC drugs are inexpensive and widely available in the market and can be purchased without a prescription in the absence of physician control. In veterinary medicine, when purchased by the owner without the control of the veterinarian/physician, these drugs can be used therapeutically wrong due to confusion or pronunciation errors, as well as for abuse or suicide in human medicine. In children and pet animals, OTC drug poisoning develops due to accidental ingestion or drug exposure without an attendant's supervision. Today, the deliberate misuse of OTC drugs still maintains its importance in both veterinary and human medicine. Therefore, necessary precautions should be taken to prevent pets' exposure, especially cats and dogs, to intoxication with OTC drugs that may result in death. To prevent recurrence attendants, animal breeders, and owners should be informed. In this review, the toxicity of OTC drugs which are widely used and easily accessible non steroidal anti inflammatories such as aspirin, ibuprofen, acetaminophen; gastric protectants such as H2 receptor antagonists; proton pump inhibitors; emetics such as ipecac syrup; antihistamines such as diphenhydramine, loratidine; decongestants, eye drops, vitamins, laxatives along with anti tussives, and clinical consequences resulting from their misuse and environmental risk factors that may cause intoxication with these drugs, as well as treatment options that can be applied in case of exposure to these drugs, were examined.

**Keywords:** *Cat, Dog, Intoxication, Non-prescription drug, OTC drug, Symptom.*

### Giriş

Herhangi bir bireyin / hayvan sahibinin "tezgah üstünden" reçetesiz olarak satın alabildiği, herhangi bir sağlık kuruluşuna veya hekime başvurmadan, yaygın ve ciddi olmayan hastalıkların tedavisinde etkili ve kısa süreli kullanım için güvenli kabul edilip prospektüsüne uygun kullanılması gereken edilen ilaç grubu, tezgah üstü (Over the counter / OTC) ilaç olarak tanımlanmaktadır (Hughes ve ark., 2001; Kartal ve Arısoy, 2017). Amerika Birleşik Devletleri'nde Food and Drug Administration (FDA) tarafından OTC grubu ilaçlar prospektüste belirtilen

talimatlar doğrultusunda, gerekli durumlarda kullanıldığında güvenli ve etkili (FDA, 2016) olarak; Türkiye'de ise reçete gerektirmeyen ilaçlar olarak mevzuatta tanımlanmıştır (Resmi Gazete, 2005).

Evcil hayvanlar, özellikle kedi ve köpekler, günümüzde ailelerimizin bir parçası haline gelmiştir. Artan yetiştiricilik uygulamaları ve pet hayvanlarının tedavi ve korunması ile gelişmelerinin düzenlenmesi süreci daha çok miktarda veteriner ilaçların kullanılmasını gerektirmiştir (Temamoğulları, 2018). Bireyler, hastalık durumunda, önceki

deneyimlerinden hareketle ya ellerindeki mevcut ilaçlardan birini kullanabilmekte veya tavsiye yoluyla ilaç alıp bu ilaçları kullanabilmektedirler (Kartal ve Arısoy, 2017). Bu durum ile orantılı olarak OTC grubu ilaçlara talep de artmıştır (Gülpınar ve Özçelikay, 2015). Dozajlama önerileri, hayvan cüssesinin yanı sıra, anatomik farklılıklar ile birlikte ilaç metabolizmasına ve ilaç sensitivitesine dayanmaktadır (Singh, 2020). Herhangi bir OTC ilaç kullanımında ilacın mevcut hastalık durumunu şiddetlendirebileceği veya daha ciddi bir hastalığı maskeleyebileceği unutulmamalıdır (Marmulak ve ark., 2014). Bu sebeple kendi kendine ilaç kullanımında, hastanın kendi minor hastalıklarının tedavisinde kullandığı ilaçların sorumluluğunu da aldığı anlamına gelmektedir (Gülpınar ve Özçelikay, 2015). İki bin yedi yılında Amerikan Veteriner Hekimliği Birliği (American Veterinary Medical Association) Amerika halkının %37'sinin köpek, %32'sinin kedi sahibi olduğunu bildirmiştir (Shepherd, 2008). Benzer şekilde Türkiye'de son yıllarda evcil hayvanlara olan talep artmıştır. Buna karşın, hayvan sahiplerinin hayvanları konusunda ne derece doğru bilgiye sahip oldukları bilinmemektedir (Salgırlı ve ark., 2012). Beşeri hekimlikte yapılan bir çalışmada reçete edilmiş ilaçların %50'sinin hasta bireyler tarafından kullanılmadığı, bu oranın OTC ilaçlarda daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Goldfrank ve ark., 2002). Ayrıca, OTC grubuna dönüştürülen ilaçların sağlık harcamalarının azaltılmasına katkısı olacağı düşünüldüğünde, kötü kullanım ve mevcut hastalığı baskılama gibi durumların ise daha fazla sağlık harcamasına sebep olduğu da bildirilmektedir (Kartal ve Arısoy, 2017).

Temelde tüm ilaçlar hem şifa verici hem de toksik etkilere sahiptir ve doğru kullanıldığında canlı sağlığını ve yaşamını tehdit eden hastalıklara son verebilirler (Kartal ve Arısoy, 2017). Belirgin fiziksel özelliklerinin yanı sıra kullanılan ilaçların vücutta oluşturduğu etki bakımından her hayvan tek ve özeldir. Bu sebeple, hayvanlardaki ilaç metabolizmasının insanlardaki ilaç metabolizmasına benzer olabileceği düşünülmemelidir (Martignoni ve ark., 2007). Bu durum, domuzların sülfonasyon, köpeklerin asetilasyon ve kedilerin glukronidasyon reaksiyonlarını gerçekleştiremediklerini bildiren çalışmalarla desteklenmektedir (Baggot, 2001). Ayrıca insanlardaki 20-30 saatlik total gastrointestinal geçiş zamanı ile karşılaştırıldığında köpeklerin 6-8 saatlik kısa gastrointestinal geçiş zamanı, insan kullanımı için üretilmiş ilaçların, köpeklerde beklenen terapötik etkiyi göstermesini engeller (Martinez ve Papich., 2008). Bu farklılıklar, hangi türlere hangi ilaçların verilir verilmeyeceğini göstermekte tek başına yeterlidir (Marmulak ve ark., 2014).

OTC grubu ilaç toksikasyonlarının klinik görünümü ve semptomları hakkında bilgi sahibi olmak hızlı müdahale açısından hayati önem taşır. Bu derlemede veteriner hekimlikte sık kullanılan OTC grubu ilaçlardan propilen glikol ve ksilol gibi solventlerin; ibuprofen, ranitidin, omaprazol, difenhidramin ve loperamid gibi bileşenlerin kedi ve köpeklerde kullanımı sonucu ortaya çıkabilecek klinik sonuçları ile birlikte intoksikasyon durumlarında uygulanabilecek tedavi seçenekleri incelenmiştir.

## İlaç Solventleri

ilaç solventleri / taşıyıcıları OTC ilaç önerisi yapılırken dikkat edilmesi gereken bir durumdur. Çoğu ilaçta solvent olarak propilen glikol ve ksilol kullanılmaktadır (Arakelyan, 2020). Kedilerde 1.6 mg/kg dozunda propilen glikolün Heinz cisimciği anemisine (Baetge ve ark., 2020); çok düşük dozlarda bile ksilolün kedi ve köpeklerde ataksi, nöbet, koma, letarji, kusma, taşikardi, hipokalemi, hepatotoksitesite ve ölüme sebep olduğu bildirilmiştir (Niaz ve ark., 2015). Tedavide, solventin mideden daha fazla emilimini engellemek önemlidir. Nörolojik semptom gelişmiş hayvanlarda kusmanın uyarılması önerilmemektedir. Ayrıca 4-metil-pirazol kullanımının (125 mg/kg başlangıç dozu), alkol dehidrogenaz inhibisyonunda güvenli ve etkili olduğu bildirilmektedir (Keller ve Goddard, 2005).

## Non steroid Antienflamatuvarlar

**Aspirin:** Asetaminofen gibi diğer non steroid antienflamatuvar ilaçların artan kullanımı, aspirin toksisitesinin insidansını düşürse de aspirin ve aspirin kombinasyonlarının (asetaminofen ve ibuprofen ile) reçetesiz kullanımı, kronik kullanımında aspirin dozunun artışı gibi durumlar, bu ilacın toksikasyonunun önemini korumasına katkı sağlamaktadır (Gerald ve O'Malley, 2007). Aspirin toksikasyonlarında bir diğer kafa karıştırıcı problem; bebek, çocuk, genç veya erişkin dozu gibi terimlerin kullanılması ve bu terimlerin halk tarafından yanlış anlaşılmasıdır. Bu sebeple maksimum aspirin dozu hayvanın yaşına göre değil vücut ağırlığına göre hesaplanmalıdır (Cadavid, 2017). Aspirin toksikasyonunun en yaygın bulgusu gastrik irritasyondur (Gil-Villa ve ark., 2012). Kedilerde aspirin toksikasyonu, köpeklere kıyasla kazara sindirimden çok yüksek dozda kullanım sonucu gelişir. Kedi ve köpeklerde gözlenen yaygın klinik bulgular anoreksi, bulantı, kusma, metabolik asidoz, nöbet ve komadır. Ayrıca aspirin toksikasyonuna bağlı hepatit olguları da bildirilmiştir (Lee, 2013). Asetilsalisilik asidin herhangi bir spesifik antidotu

yoktur ve aspirin toksikasyonunun tedavisi semptomatiktir (Handa ve ark., 2018). Erken dönemde emilimi azaltmak için emetikler kullanılabilir. Medikal tedavinin temel hedefi, non steroid antienflamatuvar kullanımına bağlı oluşan gastroduodenal lezyonların onarımı ve ülserlerin iyileşmesidir (Ponnusamy ve ark., 2018).

**İbuprofen:** Naproksen, oksaprozin, fenoprofen ve ketoprofen ile ilişkili bir propiyonik asit türevi olan ibuprofen, en sık kullanılan non steroid antienflamatuvardır (Abrahm, 2005; Bushra ve Aslam, 2010). İnsanların aksine hayvanlarda ibuprofen, diğer non steroid antienflamatuvar ilaçlar gibi enterohepatik dolaşıma girer. Tüm türlerdeki genç hayvanlarda ilacın metabolizması ve klirensi daha yavaştır (Durakovic ve Vitezic, 2013). İbuprofen toksikasyonu böbrekleri, gastrointestinal ve hematopoietik sistemi, ve yüksek dozlarda merkezi sinir sistemini etkiler (Bolfer ve ark., 2014). Bu sebeple, yaygın klinik belirtiler bulantı, kusma, abdominal ağrı, gastrointertinal ülserasyon, renal yetmezlik ve merkezi sinir sistemi depresyonudur (Talcott, 2006). Yapılan çalışmalarda köpeklerde gastrik lezyonların oluşması için 8 mg/kg, kedilerde 50 mg/kg dozun yeterli olduğu bildirilmiştir (Bolfer ve ark., 2014). İbuprofen toksikasyonunun tedavisi semptomatiktir ve misoprostol gibi prostaglandin analogları (kedilerde 8-12 saatte bir 0.25 gram; köpeklerde 8 saatte bir 2/5 mikrogram/kg, oral) antiemetikler ve gastrik protektanlar kullanılabilir (Champion ve ark., 1997; Fitzgerald ve ark., 2006).

**Naproksen:** İbuprofene benzer şekilde naproksen de bir propiyonik asit türevidir. Yüksek dozlarda aspirin, indometasin, ibuprofen ve naproksen kullanımının köpeklerde glikozaminoglikan sentezini azaltarak kıkırdak dejenerasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir (Kicera-Temple ve ark., 2019). İnsanlarda ve köpeklerde naproksen, karaciğerde metabolize olur. İnsanlarda başlıca atılım yolu idrar, köpeklerde ise kısmen safra ve enterohepatik dolaşımdır (Khan ve McLean, 2012). Köpeklerde 5 mg/kg dozun, gastrointestinal lezyonlara, 22 mg/kg dozun duodenal ülser, perforasyon ve peritonitise ve kedilerde gastrointestinal bulgulara ek olarak renal yetmezliğe de sebep olduğu rapor edilmiştir (Fitzgerald ve ark., 2006). Naproksen toksikasyonu durumlarında emetik, aktif karbon, intravenöz sıvı sağaltımı ve terapötik plazma değişimi (Therapeutic plasma exchange / TPE) uygulamalarının olumlu sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Fitzgerald ve ark., 2006; Kicera-Temple ve ark., 2019).

**Asetaminofen:** Günümüzde en sık kullanılan analjezik / antipiretik asetaminofendir. Hepatotoksik etkilerine rağmen insanlarda güvenli kabul edilse de evcil hayvanlar toksik etkilere daha duyarlıdır (Fitzgerald ve ark., 2006). Köpeklerde

toksikite bulguları 600 mg/kg'da başlar fakat daha düşük dozlarda da klinik bulguların geliştiğini bildiren raporlar mevcuttur (Hjelle ve Grauer, 1986). Köpekler ile karşılaştırıldığında kediler asetaminofenin etkilerine daha çok duyarlıdır. Kedilerin köpeklere kıyasla asetaminofene aşırı duyarlılığının sebebi düşük glukronidasyon kapasiteleridir ve rapor edilmiş toksik doz 50-100 mg/kg arasındadır (Talcott, 2006). Kedi ve köpeklerde asetaminofen toksikasyonunun temel mekanizması hücresel glutasyon tüketimidir. Asetaminofen toksikasyonunun köpeklerdeki klinik bulguları karaciğer hasarı ve nekrozudur. Bununla birlikte bulantı, kusma, abdominal ağrı, taşipne, taşikardi, sarılık ve methemoglobinemi durumları ile hematüri, hemoglobinüri, siyanoz ve fasiyal ödem gözlenebilir (Fitzgerald ve ark., 2006). Kedilerde gözlenen yaygın bulgular ise depresyon, kusma, hipotermi, solunum güçlüğü, siyanoz, yüz ve ekstremitelerde ödemdir. Erkek kedilerde hepatotoksikite bulguları daha çoktur (Talcott, 2006). Asetaminofen toksikasyonunun geleneksel antidotu, hücresel glutasyon depolarını koruyan glutasyon prekürsörleridir. Bunun için %10-20'lik steril solüsyonda N-asetil sistein 140 mg/kg dozda intravenöz veya oral yol ile kullanılabilir. Bu dozu takiben 70 mg/kg doz, 5-7 kür şeklinde intravenöz veya oral yol ile tekrar edilir. Diğer tedavi seçeneği olarak hücre membran fonksiyonu ve glutasyon için önemli fosfolipid üretiminde rol oynayan S-adenozilmetiyonin, sülfür donörü olarak kullanılabilir (Webb ve ark., 2003).

## Mide Koruyucu (Gastrik Protektanlar)

**H2 Reseptör Antagonistleri:** Gastrointestinal sistemin mukozal bariyeri yangı, erozyon ve ülseratif lezyon gelişimine sebep olan toksinlere, reaktif oksijen türlerine (ROS), mikroorganizmalara ve ilaçlara sürekli maruz kalır (Marks ve ark., 2018). Kedi ve köpeklerde gastrointestinal doku hasarları ve kanamalar, neoplazi ve ülserojenik ilaç kullanımı gibi pek çok duruma bağlı gelişebilir (O'Marra ve ark., 2011). Bu tip durumlarda famotidin ve ranitidin gibi H2 reseptör antagonistleri, kedi ve köpeklerde güvenli bir şekilde kullanılabilen ilaçlardır. Günlük 0.5 mg/kg'dan başlayan dozlarda kullanımı uygun kabul edilmektedir (Fitzgerald ve ark., 2006; Marks ve ark., 2018). Genel olarak H2 reseptör antagonistleri, az sayıda yan etki ile birlikte iyi tolere edilen ilaçlar olarak kabul edilirler. Fakat insanlarda olduğu gibi renal disfonksiyonlu kedi ve köpeklerde yüksek dozlarda kullanımı önerilmemektedir (Tolbert ve ark., 2011). Ranitidin karaciğerde metabolize olduğundan hepatik disfonksiyonlu hastalarda dikkatli kullanılmalıdır (Marmulak ve ark., 2014).

**Proton Pompa İnhibitörleri:** Gastrik asit sekresyonu regülasyonunun aydınlatılması ve H2 reseptör antagonistleri ile birlikte proton pompa inhibitörlerinin geliştirilmesi, asit ile ilişkili gastrointestinal hastalıkların tedavisine yenilikler getirmiştir (Nehra ve ark., 2018). Omeprazol, pantoprazol, esomeprazol ve lansaprazol gibi proton pompa inhibitörleri, asit üretiminin son yolağını hedef alan ilaçlardır ve H2 reseptör antagonistlerine göre gastrik pH'ın yükseltilmesinde, asit ile ilişkili doku hasarlarının iyileştirilmesinde faydalıdır (Barkun ve ark., 2012). Bu grup ilaçların insanlarda gereğinden fazla reçete edildiği bilinmektedir (Othman ve ark., 2016). Ösefagitis ve gastrointestinal ülser bulunan kedi ve köpeklerde omeprazol, günlük 0.5-1 mg/kg dozunda iyi tolere edilse de anoreksi, kusma ve bulantı gibi yan etkilere sebep olabileceği bildirilmiştir (Marks ve ark., 2018). Ayrıca yapılan bir çalışmada, standart doz ranitidin (1.5–2.3 mg/kg) ve günlük tek doz omeprazol (1.1–1.3 mg/kg) kullanımının kedilerde gastrik asit üretimini baskılamada yetersiz olduğu, sadece günde iki kez oral omeprazol kullanımının etkili olduğu bildirilmiştir (Šutalo ve ark., 2015).

**Antiasitler:** Mide koruyucu ilaçlar arasında en eski ilaçlar, antiasitlerdir ve çözünebilir olmayan alüminyum hidroksit, kalsiyum karbonat ve magnezyum hidroksit gibi inorganik maddelerden oluşurlar (Maton ve Burton, 1999; Fitzgerald ve ark., 2006). Alüminyum içeren antiasitlerin en yaygın yan etkisi konstipasyondur (Marks ve ark., 2018). Renal hastalıklarda, magnezyum ve alüminyum birikimi gözlenebilir ve ileri renal yetmezlikli köpeklerde alüminyum hidroksit uygulamasından sonra alüminyum toksikasyonu gelişebilir (Segev ve ark., 2008). Kalsiyum karbonat antiasitleri gastroenteritis ve renal yetmezliğe bağlı hiperfosfatemi durumlarında; alüminyum hidroksit antiasitlerin ise fosfat bağlayıcı olarak kullanılabilmesi rapor edilmiştir (Marks ve ark., 2018). Kedi ve köpeklerde antiasit tabletlerinin sık kullanımı ile ilişkili bildirilmiş yan etkiler; iştah kaybı, ürolit oluşumu ve konstipasyondur (Marks ve ark., 2018; Marmulak ve ark., 2014). Akut tedavisinin temeli, daha fazla emilimin azaltılması ve kusmanın uyarılmasındır (Fitzgerald ve ark., 2006).

**Sukralfat:** Sukralfatlar, yüksek protein konsantrasyonuna sahiptirler ve hasarlı mukoza bölgesinde fibrinojen, albumin veya globulinler ile kararlı protein bileşikleri oluştururlar (Marks ve ark., 2018). Asit ile ilişkili mukozal kanamalı köpeklerde canlı dışında (ex vivo) yapılan bir çalışmada, sukralfatın gastrik mukozal hasar onarımının uyarılmasında kısa sürede etkili olduğu bildirilmiştir (Hill ve ark., 2018). Kedi ve köpeklere sukralfatın süspansiyon formunun tabletlere göre beklenen

etkiyi göstermede daha faydalı olabileceği bildirilmiştir (KuKanich ve ark., 2016). Kedi ve köpeklerde sukralfat toksikasyonlarında, antiasitlere benzer olarak konstipasyon, kusma, abdominal ağrı, indigesyon ve alerjik reaksiyon görülebileceği bildirilmiştir (Marks ve ark., 2018).

**Emetikler:** Kedi ve köpeklerde toksin veya ilaç sindiriminin akut olgularında gastrointestinal kontaminasyonu azaltmak hayati önem arz eder. Bu sebeple, kedi ve köpek bulunan evlerde her zaman bir emetik bulundurulması önerilmektedir (Fitzgerald ve ark., 2006). Sindirilen maddenin kostik, asidik, uçucu, petrolatum veya deterjan bazlı olması durumlarında ve merkezi sinir sistemi veya solunum depresyonu varlığından emetik kullanımı kontraendikedir (Elwood ve ark., 2010). İpeyak şurubunun satışı yasaklandığından, sık kullanılan emetik olarak %3'lük hidrojen peroksit ön plana çıkmıştır (López-Jaimes., 2016). Emetik olarak %3'lük hidrojen peroksitin aşırı kullanım durumlarında köpeklerde şiddetli gastrik dejenerasyon, mukozal ödem, hemoraji ve nekroz geliştiği, apomorfine kullanımında ise gastrik lezyonların minimal düzeyde olduğu bildirilmiştir (Niedzwecki ve ark., 2016). Kedi ve köpeklerde toksikasyon durumlarında tedavi semptomatiktir ve antiemetik ve gastrik protektan (ranitidin veya omeprazol gibi) uygulamalarını içerir (Fitzgerald ve ark., 2006; Marks ve ark., 2018., Marmulak ve ark., 2014).

**Antihistaminikler / Dekonjestanlar:** Antihistaminik olarak da adlandırılan H1 reseptör antagonistleri dünya çapında yaygın kullanılan ve reçetesiz olarak alınabilen ilaçlardır (Fitzgerald ve ark., 2006; Talcott, 2006). Setirizin gibi ikinci kuşak antihistaminikler, kan beyin bariyerindeki p-glikoproteine olan yüksek affiniteleri sebebi ile sedatif etki göstermez. Bu sebeple Avrupa'da köpekler için kullanımı uygun kabul edilmiştir (Ekstrand ve ark., 2018). Sempatomimetik ajanlar olan dekonjestanların etki mekanizmaları, alfa adrenerjik reseptörler aracılığı ile vazokonstriksiyondur (Febbraro, 2020). Genellikle nazal dekonjestan olarak kullanılırlar da göz iritasyonu ve kızarıklıklar için kullanılan oftalmik formülasyonlar da bulunmaktadır (Fitzgerald ve ark., 2006). Kaşıntılı dermatitis bulunan köpeklerde en sık kullanılan OTC grubu ilaç antihistaminiklerdir. Difendihramin; antihistaminik, sedatif, antiemetik veya yol / araç tutması önleyici özelliklerinden dolayı daha sık kullanılmaktadır (Hensel ve ark., 2015). Köpeklerde difenhidramin kullanımı ağız kuruluşuna ve idrar retensiyonuna, kedilerde ise hipereksitasyona neden olduğu bildirilmiştir (Buchweitz ve ark., 2014). Pet hayvanlarında kullanılan bir diğer antihistaminik loratidindir. Şurup formu propilen glikol içerdiğinden kedilerde



kullanılmamalıdır (Scott ve ark., 2015). Yan etki olarak hiperaktivite, taşikardi veya depresyon bildirilmiştir (Fitzgerald ve ark., 2006; Buchweitz ve ark., 2014; Marmulak ve ark., 2014). Ayrıca kedi ve köpeklerde sedasyon, letarji, paradoksal eksitasyon, anoreksi ve diyare gibi yan etkiler de göz önünde bulundurulmalıdır (Fitzgerald ve ark., 2006). Aşırı doz antihistaminik veya dekonjestana maruz kalmış hayvanlarda tedavi seçeneği olarak aktif kömür düşünülmelidir (kedi ve köpeklerde değişkenlik gösterse de önerilen doz, 2-5 gr/kg). Ajitasyon, taşikardi veya nöbet geçiren evcil hayvanlarda antikonvülzan kullanımı önerilmektedir. Ventriküler disritmiler lidokain ile tedavi edilebilir (Kang ve Park, 2012; Buchweitz ve ark., 2014).

**Göz Damlaları:** Kedi ve köpeklerde, insanlara benzer şekilde alerjik konjunktivitis gelişebilir ve bu durumlarda hayvan sahipleri sıklıkla göz damlaları için eczanelere başvurur. Hastalık durumu daha çok genç hayvanlarda ve mevsimsel alerji şeklinde başlar. Alerjenler genellikle polen, küf ve ev tozlarıdır. Pug, Dalmatian, West Highland terrier ve Cairn terrier gibi ırkların alerjik konjunktivitise predispoze olduğu bildirilmektedir (Glaze, 1991). Antihistaminik / dekonjestan göz damlaları OTC grubu ilaçlar olarak sıklıkla kullanılsa da semptomimetik dekonjestanlar evcil hayvanlar tarafından tolere edilmez (Marmulak ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada fenilefrin göz damlasının sistemik olarak absorbe edildiği ve hipertansiyona sebep olduğu bildirilmiştir (Herring, 2013). Reçete ile satılan göz damlaları OTC olarak piyasada bulunsa da oftalmik antihistaminiklerin kedi ve köpeklerde etkinliğini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca, herhangi bir ekstra bileşen içermeyen suni gözyaşı preparatları kedi ve köpeklerde güvenli kabul edilse de uzun süreli kullanımdan kaçınılmalıdır (Baumer, 2011).

**Laksatifler:** Tekrarlayan konstipasyon özellikle kedilerde oldukça yaygın bir sağlık sorunudur. Etkilenmiş hayvanların yaşam kalitesini arttırmak için sıklıkla laksatif kullanımına başvurulur (Tam ve ark., 2011). Konstipasyonlu kedi ve köpeklerde tedavi amaçlı çözünen veya çözünmeyen lif, laktuloz ve polietilen glikol gibi pek çok laksatifin kullanımı önerilmektedir (Zoran, 1999). Kedi ve köpeklerde laksatif ilaç kullanımı sırasında su alımı veya konsere mama tüketimi teşvik edilmelidir. İntestinal obstrüksiyon riski durumlarında bisakodil ve senna ürünleri veteriner hekime danışmadan kullanılmamalıdır (Marmulak ve ark., 2014). Ayrıca kedi ve köpeklerde fosfatlı laktasifler, ölümlü sonuçlanabilen şiddetli elektrolit dengesizliklerine sebep olduklarından hiçbir zaman önerilmemelidir. Bu ilaçların aşırı ve yanlış kullanımı sonucu uygulanacak tedavi semptomatiktir. Bu kapsamda sıvı-elektrolit kayıplarının giderilmesi ve

hidrasyonun sağlanması önem arz eder (Tomsa, 2001).

**Anti diyaretikler:** Amerika Birleşik Devletleri'nde ve İngiltere'de veteriner kliniklerine en sık başvuru sebebi akut diyaredir. Yapılan çalışmalarda en yaygın tedavi seçenekleri diyet düzenlemesi (vakaların %66'sı) ve antimikrobiyal ilaç kullanımı (vakaların %63'ü) olarak bildirilmiştir (Fitzgerald ve ark., 2006; Nixon ve ark., 2019). Loperamid, diyare geliştiği durumlarda gastrointestinal motiliteyi azaltmak için kullanılan bir sentetik opiattır. Enfeksiyöz diyare durumlarında kullanılmamalı veya dikkatli kullanılmalıdır. Opiatlar kedilerde eksitasyona sebep olduğundan kedilerde önerilmemektedir. Ayrıca Collie, Sheltie, Old Dog Shepherd ve Alman çoban ırkı köpeklerdeki genetik bir bozukluk sebebi ile ilacın kan beyin bariyerini geçip derin sedasyona sebep olabileceği unutulmamalıdır (Hugnet, 1996). Loperamide bağlı sedasyon nalokson ile geri dönüşümlü olarak tedavi edilse de acil müdahale gerektirebilir. Köpeklerde kullanımda konstipasyon, abdominal gerginlik ve sedasyon gibi yan etkiler göz önünde bulundurulmalıdır. Kedilerde salisilatlar sistemik olarak emildiğinden aşırı kullanımdan kaçınılmalıdır (Fitzgerald ve ark., 2006; Marmulak ve ark., 2014).

**Anti tüssifler:** Kedi ve köpek sahiplerinin sıklıkla başvurduğu bir diğer OTC ilaç grubu öksürük (anti tüssif) ilaçlarıdır. Akut öksürükler enfeksiyöz trahebronşitis veya barınak öksürüğü olarak değerlendirilebilir ve uygun antibiyotik tedavisi gerektirir (Schulz ve ark., 2014). Alerjiye veya bronşite bağlı kronik öksürük durumlarında dekstrometorfan kullanımı uygundur. Yapılan bir çalışmada 0.5-2 mg/kg dozunda, günde 3 kez kullanımın uygun olduğu bildirilmiştir (Kukanich ve Papich, 2004). Sedasyon ve kusma, bildirilen yan etkiler arasındadır (Fitzgerald ve ark., 2006).

**Vitaminler:** Vitaminler, bazı eksiklik sendromlarının önlenmesinde kullanılan, optimum beslenme diyetleri için vazgeçilmez kabul edilen organik mikro besin maddeleridir. Suda çözünen vitaminler fazla miktarda alındığında renal yol ile atılsa da kronik olarak çok yüksek dozlara maruz kalma sonucu yan etkiler görülebilir. Yağda çözünen vitaminler ise dokularda depolanır ve aşırı tüketimleri genellikle toksikasyon ile sonuçlanır. (Bontempo, 2005).

**A Vitamini Toksikasyonu:** A vitamini epitelyum ve mukus salgılayan dokuların yapısal bütünlüğünün korunmasında, kemik büyümesinde, üreme ve embriyolojik fonksiyonların devamlılığında rol oynar (Bergen ve Roles, 1965). A vitamininin %90'ı karaciğerde depolanır. A vitamini toksikasyonunda yaygın klinik bulgular anoreksi, letarji, kusma, deri ve tüy yapısındaki bozukluklar ve gingivittir (Bergen ve Roles, 1965; Fitzgerald ve ark., 2006).

Karaciğerin etkilendiği durumlarda hepatomegali, hepatitis, portal hipertansiyon ve siroz gelişebilir. Akut toksikasyonun tedavisinde vitamin kullanımı kesilmeli ve gastrik dekontaminasyon yoluna gidilerek daha fazla emilim önlenmelidir (Hamilton, 2002; Fitzgerald ve ark., 2006).

**D Vitamini Toksikasyonu:** D vitamini, güneş ışığının etkisiyle deride kolesterolden üretilen, yağda çözünen bir vitamindir. Kedi ve köpeklerde, çiftlik hayvanlarında ve insanlarda takviye olarak kullanımının yanında bir rodentisit olarak artan kullanımı toksikasyon riskini de arttırmaktadır (Chavhan ve ark., 2011). Klinik bulgular sindirimden sonra artan kalsiyum metabolizmasına ve emilim derecesine bağlıdır. Yaygın bulgular anoreksi, kusma, hipertansiyon, hiperkalsemiye bağlı sekonder olarak gelişen hiperkalsüri, renal hasar ve yumuşak doku kalsifikasyonudur (Marmulak ve ark., 2014). Yüksek dozlarda D vitaminine maruz kalmış hayvanların tedavisinde sıvı sağaltımı ve diüretik kullanımı önemlidir. Serum kalsiyum seviyesinin takibi, hastanın prognozu hakkında bilgi verir (Fitzgerald ve ark., 2006).

**C Vitamini Toksikasyonu:** C vitamini (askorbik asit) kedi ve köpekler dahil çoğu türde karaciğerde sentezlenen, vücut dokularının hemen hemen hepsinde bulunan suda çözünen bir vitamindir. Hasar verici peroksit radikallerinin detoksifikasyonunda hidrojen donörü olarak rol oynar (Gordon ve ark., 2020; Talcott, 2006). C vitamini toksikasyonunun kedi ve köpeklerde klinik bulguları anoreksi, kusma, diyare gibi gastrointestinal bozukluklar ile üriner kalkuli (oksalat, urat ve sistin) oluşumudur (Gordon ve ark., 2020). Semptomatik tedavinin yanı sıra, çoğu zaman C vitamini kullanımının bırakılması klinik bulguların ortadan kalkması için yeterlidir (Fitzgerald ve ark., 2006).

**B6 (Piroksidin) Vitamini Toksikasyonu:** Piroksidin insanlarda hiperaktivite, premenstrual sendrom tedavisi ve sporcu gıda takviyesi gibi çok çeşitli amaçlar için kullanılan suda çözünür bir vitamindir. Ayrıca insanlarda gebelikte bulantı ve kusmanın azaltılmasında etkili olduğu rapor edilmiştir (Jarolmasjed ve Kolahian, 2013). Kedi ve köpeklerde yüksek dozlarda tüketim sonucu gelişen klinik bulgular genellikle önemsiz olsa da ataksi, duruş bozuklukları ve sensorik nöropati gibi sinir sistemi bulguları bildirilmiştir (Vroljik ve ark., 2017). Piridoksin toksitesinin spesifik bir antidotu veya tedavisi bulunmadığından tedavi semptomatiktir (Gummin ve ark., 2018).

## Sonuç

Pet hayvanı hekimliğinde OTC grubu ilaç kullanımı giderek artmaktadır. Bu konuda veteriner

hekimlerin, eski formülasyonların yanı sıra yeni preparatları ve bunların etki mekanizmalarını tanımları önem arz etmektedir. Toksik maddenin ve etki mekanizmasının tanımlanması ve olası tedavi yaklaşımının hızlı bir şekilde planlanması tedavide başarıyı etkileyen önemli unsurlardır. Bununla birlikte halkın toksikoloji, antidot kullanımı ve ilaçların ev içinde uygun şekilde muhafazası ve uzaklaştırılması konusunda bilgilendirilmesi, giderek artan OTC ilaç kullanımına bağlı kedi ve köpeklerde gözlenen toksikasyonları ile mücadelede ve tedavi protokollerinde yardımcı olacaktır.

## Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

## Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve / veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

## Kaynaklar

- Abrahm KD, 2005: Nitro-argenine methyl ester, a non selective inhibitor of nitric oxide synthase reduces ibuprofen-induced gastric mucosal injury in the rat. *Dig Dis*, 50 (9), 1632-1640.
- Arakelyan HS, 2020: Propylene Glycol, Food and Health. *Clinical Food Toxicology*.
- Baetge CL, Smith LC, Azevedo CP, 2020: Clinical Heinz Body Anemia in a Cat After Repeat Propofol Administration Case Report. *Front Vet Sci*, 7, 828.
- Baggot JD, 2001: The pharmacokinetic basis of species variations in drug disposition In: *The Physiological Basis of Veterinary Pharmacology*, Baggot MVM (ed), 1-54. Blackwell Science, London.
- Barkun AN, Bardou M, Pham CQ, Martel M, 2012: Proton pump inhibitors vs. histamine 2 receptor antagonists for stress-related mucosal bleeding prophylaxis in critically ill patients: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 107, 507-520.
- Baumer W, 2011: The use of ophthalmic drugs in the dog and cat. *Kleintierpraxis*, 56 (11), 604-614.
- Bergen S, Roels O, 1965: Hypervitaminosis A. *Am J Clin Nutr*, 16, 265-269.
- Bolfer L, Mcmichael M, Ngwenyama TR, O'Brien M, 2014: Treatment of Ibuprofen Toxicosis in a Dog with IV



- Lipid Emulsion. *J Am Anim Hosp Assoc*, 50 (2), 136-140.
- Bontempo V, 2005: Nutrition and health of dogs and cats: evolution of petfood. *Vet Res Commun*, 29 (2), 45-50.
- Buchweitz JP, Raverty SA, Johnson MB, Lehner AF, 2014: Fatal diphenhydramine poisoning in a dog. *Can Vet J*, 55 (11), 1089-1092.
- Bushra R, Aslam N, 2010: An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen. *Oman Med J*, 25 (3), 155-1661.
- Cadavid AP, 2017: Aspirin: The Mechanism of Action Revisited in the Context of Pregnancy Complications. *Front Immunol*, 15, 8, 261.
- Champion GD, Feng PH, Azuma T, Caughey DE, Chan KH, Kashiwazaki S, Liu HC, Nasution AR, Nobunaga M, Prichanond S, Torralba TP, Udom V, Utis D, Wang SR, Wong WS, Yang DJ, Yoo MC, 1997: NSAID-induced gastrointestinal damage. Epidemiology, risk and prevention, with an evaluation of the role of misoprostol. An Asia-Pacific perspective and consensus. *Drugs*. 53 (1), 6-19.
- Chavhan SG, Brar RS, Banga HS, Singh ND, 2011: Cholecalciferol toxicity in animals. *Vet Clin Path*, 1-4.
- Durakovic Z, Vitezic D, 2013: Pharmacodynamics and pharmacokinetics in the elderly. *Period Biol*, 115 (4), 517-520.
- Elwood C, Devauchelle P, Elliott J, Freiche V, German AJ, Gualtieri M, Hall E, den Hertog E, Neiger R, Peeters D, Roura X, Savary-Bataille K, 2010: Emesis in dogs: a review. *J Small Anim Pract*, 51 (1), 4-22.
- Febbraro S, Shea T, Cravo AS, 2020: Bioavailability of Triprolidine as a Single Agent or in Combination With Pseudoephedrine: A Randomized, Open-Label Crossover Study in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 9 (4), 486-495.
- Fitzgerald KT, Bronstein AC, Flood AA, 2006: "Over-The-Counter" Drug Toxicities in Companion Animals. *Clin Tech Small Anim Pract*, 21, 215-226.
- Gerald F, O'Malley DO, 2007: Emergency Department Management of the Salicylate-Poisoned Patient. *Emerg Med Clin N Am*, 25, 333-346.
- Gil-Villa AM, Norling LV, Serhan CN, Cordero D, Rojas M, Cadavid A, 2012: Aspirin triggered-lipoxin A4 reduces the adhesion of human polymorphonuclear neutrophils to endothelial cells initiated by preeclamptic plasma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 87(4-5), 127-134.
- Glaze MB, 1991: Ocular allergy. *Semin Vet Med Surg Small Anim*, 6 (4), 296-302.
- Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, 2002: Goldfrank's Toxicologic Emergencies. 7. ed., New York, McGraw-Hill.
- Gordon DS, Rudinsky AJ, Guillaumin J, Parker VJ, Creighton KJ, 2020: Vitamin C in health and disease: A companion animal focus. *Top Companion Anim Med*, 39, 1-9.
- Gülpınar G, Özçelikay G, 2015: OTC Drug Regulations in Turkey: The Opinions of Community Pharmacists and Drug Industry. *Turk J Pharm Sci*, 12 (3), 267-278.
- Gummin DD, Mowry JB, Spyker DA, Brooks DE, Osterthaler KM, Banner W, 2018: 2017 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 35th Annual Report. *Clin Toxicol (Phila)*, 56 (12), 1213-1415.
- Hamilton RJ, 2002: Vitamins In: Goldfrank's Toxicologic Emergencies (ed 7), Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA (eds), 563-569, New York, NY, McGraw-Hill.
- Handa O, Takayama S, Mukai R, Suyama Y, Majima A, Fukui A, Omatsu T, Naito Y, 2018: A review of the mechanism and prophylaxis of acetyl salicylic acid-induced injury of the small intestine. *Free Radic Res*, 52 (11-12), 1266-1270.
- Hensel P, Santoro D, Favrot C, Hill P, Griffin C, 2015: Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res*, 11, 11, 196.
- Herring IP (2013). Clinical pharmacology and therapeutics. Part 4: Mydriatics /cycloplegics, anesthetics and tear substitutes and stimulants In: Veterinary ophthalmology. 5th ed., Gelatt KN, Gilger BC and Kern TJ (eds), 423-434, Ames: Wiley-Blackwell.
- Hjelle JJ, Grauer GF, 1986: Acetaminophen-induced toxicosis in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*, 188, 742-746.
- Hughes, CM, McInay, JC, Fleming, GF, 2001: Benefits and risks of self medication, *Drug Saf*, 24 (14), 1027-37.
- Hugnet C, Cadore JL, Buronfosse, Pineaux X, Mathet T, Berny PJ, 1996: Loperamide poisoning in the dog. *Vet Hum Toxicol*, 38 (1), 31-33.
- Innes JF, O'Neill T, Lascelles BDX, 2010: Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of canine osteoarthritis. *In Practice*, 32 (4), 126-137.
- Jarolmasjed S, Kolahian S, 2013: Pretreatment of Cats with Vitamin B6 Reduces Vomiting Episodes Following Xylazine Administration. *Iran J Vet Surg*, 8 (1), 29-33.
- Kang MH, Park HM, 2012: Application of carvedilol in a dog with pseudoephedrine toxicosis-induced tachycardia. *Can Vet J*, 53 (7), 783-786.
- Kartal N, Arisoy S 2017: OTC Grubundaki ilaçların avantaj ve dezavantajlarının incelenmesi. *Sag Aka Derg*, 4, 4.
- Keller N, Goddard A 2005: First report of suspected ethylene glycol poisoning in 2 dogs in South Africa. *J S Afr Vet Assoc*, 76 (2), 116-119.
- Khan SA, McLean MK, 2012: Toxicology of frequently encountered nonsteroidal anti-inflammatory drugs in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 42 (2), 289-306.
- Kicera-Temple K, Londono L, Lanaux TM, Buckley GJ, 2019: Treatment of a massive naproxen overdose with therapeutic plasma exchange in a dog. *Clin Case Rep*, 7 (8), 1529-1533.
- Kukanich B, Papich MG, 2004: Plasma profile and pharmacokinetics of dextromethorphan after intravenous and oral administration in healthy dogs. *J Vet Pharmacol Ther*, 27 (5), 337-341.
- KuKanich K, KuKanich B, Guess S, Heinrich E, 2016: Effect of sucralfate on the relative bioavailability of enrofloxacin and ciprofloxacin in healthy fed dogs. *J Vet Intern Med*, 30, 108-115.
- Lee JA, 2013: Emergency Management and Treatment of the Poisoned Small Animal Patient. *Vet Clin Small Anim*, 757-771.

- López-Jaimez G, 2016: 50 Years Ago in TheJournal ofPediatrics: Ipecac Syrup: Its Use as an Emetic in Poison Control. *J Pediatr*, 174, 159.
- Marks SL, Kook PH, Papich MG, Tolbert MK, Willard MD, 2018: ACVIM consensus statement: Support for rational administration of gastrointestinal protectants to dogs and cats. *J Vet Intern Med*, 32 (6), 1823-1840.
- Marmulak T, Wiebe V, Perry M, Blythe E, 2014: Over-the-Counter Medications for Pets. *America's Pharmacist*, 3, 46-54.
- Martignoni M, Groothuis GMM, Kanter R, 2007: Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2 (6), 875-894.
- Martinez MN, Papich MG, 2008: Factors influencing the gastric residence of dosage forms in dogs. *J Pharm Sci*, 98, 3, 844-860.
- Maton PN, Burton ME, 1999: Antacids revisited: a review of their clinical pharmacology and recommended therapeutic use. *Drugs*, 57, 855-870.
- Nehra AK, Alexander JA, Loftus CG, Nehra V, 2018: Proton pump inhibitors: review of emerging concerns. *Mayo Clin Proc*, 32, 1823-1840.
- Niaz K, Bahadar H, Maqbool F, Abdollahi M, 2015: A review of environmental and occupational exposure to xylene and its health concerns. *EXCLII*, 14, 1167-1186.
- Niedzwecki AH, Book BP, Lewis KM, Estep S, Hagan J, 2016: Effects of oral 3% hydrogen peroxide used as an emetic on the gastroduodenal mucosa of healthy dogs. *J Vet Emerg Crit Care*, 27 (2), 1-7.
- Nixon SL, Rose L, Muller AT, 2019: Efficacy of an orally administered anti-diarrheal probiotic paste (Pro-Kolin Advanced) in dogs with acute diarrhea: A randomized, placebo-controlled, double-blinded clinical study. *J Vet Intern Med*, 33 (3), 1286-1294.
- Official gazette of the republic of Turkey. Regulation on the classification of human medicinal products. Dated: 17.02.2005- Issue No: 25730.
- O'Marra SK, Delaforcade AM, Shaw SP, 2011: Treatment and predictors of outcome in dogs with immune-mediated thrombocytopenia. *J Am Vet Med Assoc*, 238, 346-352.
- Othman F, Card TR, Crooks CJ, 2016: Proton pump inhibitor prescribing patterns in the UK: a primary care database study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 25, 1079-1087.
- Ponnusamy P, Muthuramalingam T, Sureshkumar R, Selvakumar G, Thangapandiyam M, Rao GD, 2018: Paracetamol Poisoning In A Cat And Its Treatment. *Ind J Vet & Anim Sci Res*, 43 (5), 388- 389.
- Salgırlı Y, Emre B, Besgül K, Öztürk H, Sagmanlıgil V, 2012: Köpek sahiplerinin köpeklerine yaklaşımlarının değerlendiril-mesi üzerine bir pilot çalışma. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 59, 11-15.
- Schulz BS, Kurz S, Weber K, Balzer HJ, Hartmann K, 2014: Detection of respiratory viruses and Bordetella bronchiseptica in dogs with acute respiratory tract infections. *Vet J*, 201 (3), 365-369.
- Scott DW, Edginton HD, Miller WH, Clark MD, 2015: An Open Clinical Trial on the Efficacy of Loratadine for the Management of Allergic Pruritus in 27 Cats. *Jpn J Vet Dermatol*, 21 (1), 7-9.
- Segev G, Bandt C, Francey T, Cowgill LD, 2008: Aluminum toxicity following administration of aluminum-based phosphate binders in 2 dogs with renal failure. *J Vet Intern Med*, 22, 1432-1435.
- Shepherd AJ, 2008: Results of the 2006 AVMA survey of companion animal ownership in US pet-owning households. *J Am Vet Med Assoc*, 232 (5), 695-696.
- Singh BR, 2020: Guidelines for antimicrobial drug use in animals. Indian Veterinary Research Institute. Technical Report.
- Şutalo S, Ruetten M, Hartnack S, Reusch CE, Kook PH, 2015: The effect of orally administered ranitidine and once-daily or twice-daily orally administered omeprazole on intragastric pH in cats. *J Vet Intern Med*. 29 (3), 840-846
- Talcott PA, 2006: Nonsteroidal antiinflammatories In: Small Animal Toxicology, Peterson ME (ed), 902-933, St. Louis, MO., Elsevier.
- Tam FM, Carr AP, Myers SL, 2011: Safety and palatability of polyethylene glycol 3350 as an oral laxative in cats. *J Feline Med Surg*, 13 (10), 694-697.
- Temamoğulları F, 2018: Veteriner İlaçlarının Çevrede İstenmeyen Etkileri. Türkiye Klinikleri Veteriner Farmakovijilans. Sekkin S (ed), 82-85, Veteriner Farmakovijilans. Ankara: Türkiye Klinikleri.
- The US Food and Drug Administration. Outsourcing Facilities. Available online: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/PharmacyCompounding/ucm393571.htm> (accessed on 25/3/2021).
- Tolbert K, Bissett S, King A, Davidson G, Papich M, Peters E, Degernes L, 2011: Efficacy of oral famotidine and 2 omeprazole formulations for the control of intragastric pH in dogs. *J Vet Intern Med*, 25, 47-54.
- Tomsa K, Steffen F, Glaus T, 2001: Life threatening metabolic disorders after application of a sodium phosphate containing enema in the dog and cat. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 143 (5), 257-261.
- Vroljik MF, Opperhuizen A, Jansen EHJM, Hageman GJ, Bast A, Haenen GRMM, 2017: The vitamin B6 paradox: Supplementation with high concentrations of pyridoxine leads to decreased vitamin B6 function. *Toxicol In Vitro*, 44, 206-212.
- Webb CB, Twedt DC, Fettman MJ, Mason G, 2003: S-adenyl-L-methionine (SAME) in a feline model of oxidative injury. *J Fel Med Surg*, 5, 69-75.
- Zoran DL, 1999: Diet and drugs: the keys to managing feline colonic disease. *Compend Contin Educ Pract Vet*, 21, 731e48.

\*Yazışma Adresi: Erdem GÜLERSOY

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Eyyübiye, Şanlıurfa, Türkiye.

e-mail: egulersoy@harran.edu.tr

## HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ YAYIN KURALLARI \*

**1-** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi (Harran Üniv Vet Fak Derg), özellikle Veteriner Hekimliği bilim alanı ile ilgili olmak üzere insan ve hayvan sağlığını kapsayan Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanmış orijinal klinik ve deneysel araştırmalar, olgu sunumları, derlemeler (çağrılı veya sorumlu yazara ait derleme konusu ile ilgili en az 3 araştırma makalesinin referans listesinde olması gereklidir), kısa bilimsel makale ve editöre mektuplar yayınlayan hakemli bir dergidir. Dergide İngilizce hazırlanmış makalelerin yayımlanmasına öncelik verilir. Dergi 6 ayda bir, yılda 2 sayı olarak yayınlanır. Yayınlanan makalelerden ücret alınmamaktadır.

**2-** Dergiye kabul edilen yayınlar başka bir yerde yayınlanmamış olmalıdır. Eş zamanlı olarak incelenmek üzere başka dergilere gönderilmiş olmamalıdır. Yayınlanan makalelerden doğacak her türlü hukuki ve cezai sorumluluk yazarlara aittir. Yazarlara yayın hakkı bedeli ödenmez. Gönderilen makaleler ve ekleri makale yayınlansın veya yayınlanmasın geri iade edilmez.

**3-** Daha önce kongrelerde tebliğ edilmiş ve özeti yayımlanmış çalışmalar, bu durum kapak sayfasında belirtilmek üzere kabul edilir. Bununla birlikte yayın, tezden üretilmiş ise ve destekleyen kuruluş var ise yayında belirtilmelidir.

**4-** Dergi Editörlüğüne ulaşan makale, dergi editörlüğüne ön değerlendirmeye tabi tutulur. Editörlük, ön değerlendirme sonucuna göre makaleyi reddetme veya hakem değerlendirmesine tabi tutmadan önce düzeltme isteme hakkına sahiptir.

**5-** Makaleler değerlendirme için en az iki hakeme gönderilir. Makale kabul sürecinde, iki hakemin görüşlerinin farklı olması durumunda editör, üçüncü bir hakemin veya danışma kurulunun görüşünü alarak karar verir.

**6-** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, etik ilkelere saygı çerçevesinde, TÜBİTAK ULAKBİM tarafından Türkiye'de tüm üniversitelerin kullanımına açmış olduğu "ithenticate" intihal tespit programı aracılığıyla gönderilen tüm makale, olgu sunumu ve derlemelerin ön değerlendirmesinin yapılması ve sonuçların gönderilmesi gerekmektedir. Bu ön değerlendirme sonuçlarına göre, makale, olgu sunumu veya derlemelerin başka kaynaklarla benzerlik oranının **%15'i** (özet, abstract ve kaynaklar hariç) aşmaması gerekmektedir. "ithenticate" programı aracılığı ile yapılacak öndeğerlendirmede benzerlik oranının %15 değerini aşması durumunda yayımlanmak üzere dergimize gönderilen makale, olgu sunumu veya derlemeler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

**7-** Gönderilen herhangi bir makalenin (tüm makale kategorileri için) referanslarının en az % 20'sinin son beş yılda yayınlanan referansları içermesi gerekir. Anonim kaynaklar asgari düzeyde tutulmalıdır.

**8-** Makale yayına kabul edildiği takdirde her türlü yayın hakkının devredildiğine dair beyanları kapsayan Telif Hakkı Devir Sözleşmesinin tüm yazarlar tarafından imzalanarak basımdan önce elektronik olarak dergi editörlüğüne gönderilmesi gerekmektedir. Telif Hakkı Devir Sözleşmesi gönderilmeyen makaleler yayımlamaya kabul edilmiş olsalar bile basılmazlar.

**9-** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderilecek makale, olgu sunumu, derleme vb. çalışmalar, <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd> adresinden gönderildiğinde değerlendirme sürecine alınmaktadır.

**10-** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderilecek makale, olgu sunumu, derleme vb. çalışmalar MS Word formatında, tüm fotoğraflar (resimler) en az 300 dpi çözünürlükte, TIFF veya JPEG formatında kaydedilmiş olmalıdır.

## YAZIM KURALLARI

Yazılar, MS Word formatında, Times New Roman yazı tipinde, 12 punto, çift satır aralıklı ve her kenardan 2.5 cm boşluk bırakılarak hazırlanmalıdır. Makaleye satır numaraları (makalenin 2. sayfasından başlamak üzere sürekli olacak şekilde) eklenmelidir. Bu şekildeki yazılar, şekil ve tablolar dâhil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalar ve derlemelerde 15, kısa bilimsel makale ve olgu sunumlarında 5 sayfayı geçmemelidir.

Birimler ve ölçüler için Uluslararası Standart birimleri (SI-sistem) kullanılmalıdır.

**Araştırma Makaleleri:** Orijinal araştırma makaleleri aşağıdaki ana konu sıralamasına göre dizilmelidir: Başlık, Yazar adları (Sorumlu yazar (\*) ile işaretlenmeli), Yazar adresleri, Yazar ORCID numaraları, Özet ve Anahtar kelimeler (3 - 6 kelime), İngilizce başlık, Abstract ve Keywords ile Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Teşekkür veya Bilgilendirme ile Kaynaklar. Her bir Tablo ve Şekil ayrı sayfalarda yer almalıdır.

## YAZIM DÜZENİ

**Özet:** Orijinal araştırma makalelerinde 250, diğer makale türlerinde 200 kelimeyi geçmeyecek şekilde hazırlanmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** En fazla 6 tane olmak üzere her iki dildeki özeti altında alfabetik sırayla verilmelidir. Anahtar kelimeler, Türkiye Bilim Terimleri arasından seçilmelidir. Anahtar kelimelerin seçiminde Türkiye Bilim Terimleri internet adresinden (<http://www.bilimterimleri.com>) yararlanılmalıdır.

**Giriş:** Sonuçların anlaşılabilirliği ve yorumlanabilirliği için o konu ile ilgili yapılmış olan çalışmalar hakkında bilgilere yer verilmelidir. Giriş'te çalışmanın hipotezi belirtilmelidir. Çalışmanın amacı bu bölümün en sonunda açık olarak yazılmalıdır.

**Materyal ve Metot:** Bu bölümde deneysel çalışmalar diğer araştırmacılar tarafından tekrarlanabilecek yeterlilikteki detayı ile verilmelidir. Uluslararası indeksli dergilerde yayınlanmış bir makalede açıklanan bir teknik kullanıldığında, metodun çok kısa açıklanması ve ilgili orijinal makaleye atıf yapılması gereklidir. Makalede etik kurul izni ve/veya yasal/özel izin alınmasının gerekip gerekmediği bu bölümde belirtilmelidir. Materyal olarak hayvan kullanılan orijinal araştırma makalelerinde (klinik, deneysel, saha çalışmaları vb.); etik kurul onayı alınmış olmalıdır. Etik kurul onay/izin belgesinin "alındığı etik kurulun ismini, sayısını ve tarihini" içeren açıklayıcı bilgiler materyal ve metot bölümüne yazılmalıdır. Yayın kurulu etik kurul onay belgesini isteme hakkına sahiptir.

**Bulgular:** Araştırma bulguları açık ve anlaşılabilir şekilde verilmelidir. Bulgular, gerektiğinde tablo ve şekillerle desteklenmeli ve kısa olarak sunulmalıdır.

**Tartışma ve Sonuç:** Bulgular gereksiz ayrıntıya girmeden literatürler ışığında tartışılmalı ve bulguların önemi vurgulanmalıdır. Sonuç ya da öneri cümlesi ile bitirilmelidir.

**Teşekkür:** Çalışma veya makaleye kişisel katkı ve parasal destek burada belirtilmelidir.

**Derleme:** Derginin yayın alanlarındaki konularda yenilikleri içeren, güncel kaynaklardan yararlanılarak hazırlanmış makaleler olup, yazarların konu ile doğrudan ilişkili en az 3 adet çalışmalarının olması ve bunların derleme içinde kullanılması durumunda yayınlanmak üzere kabul edilebilecektir. Sorumlu yazar, derlemesini gönderirken konu ile ilgili makalelerinin de künye bilgilerini dergi editörlüğüne göndermelidir (makale künyeleri, makale metninin en son sayfasında sunulmalıdır). Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nde değerlendirmeye alınan ve yayınlanan derlemeler **çağrılı derlemelerden** oluşmaktadır. Derlemelerde; Özet, Giriş, Sonuç ve Kaynaklar bölümleri bulunmalıdır.

**Olgu Sunumu:** Yazarların, karşılaştıkları yeni veya ender gözlemlenen olguların ele alındığı, bilimsel değere sahip bilgileri içeren eserlerdir. En fazla 15 kaynak kullanılmalı ve bu kaynakların güncel olmasına özen gösterilmelidir. Olgu sunumları; Özet, Giriş, Olgu tanımı, Tartışma ve Sonuç ile Kaynaklar bölümlerinden oluşmalıdır.

**Kısa Bilimsel Makale:** Kısa bilimsel makalelerde dar kapsamlı olarak ele alınmış, yeni bilgi ve bulgular sunulmalıdır. Araştırma makalesi formatında hazırlanmalı ve en fazla 5 sayfa olmalıdır. En fazla 2 tablo veya şekil içermelidir.

### **Kaynaklar**

Metin içinde atıf yapılırken;

1. Yazar veya yazarların soyadından sonra parantez içinde kaynağın yayın yılı belirtilmelidir; Adams (1998) tarafından; Wilkie ve Whittaker (1997) tarafından; Doyle ve ark. (2007) tarafından....
2. Cümlelerin sonunda atıf yapıldığında ise yazar ismi ve yayın yılı parantez içinde belirtilmelidir; ... bildirilmiştir (Adams, 1998); .... bildirilmiştir (Wilkie ve Whittaker, 1997); ..... bildirilmiştir (Doyle ve ark., 2007).
3. Birden çok kaynağa atıf yapılması durumunda önce alfabetik sonra kronolojik sıralama yapılmalıdır; .... bildirilmiştir (Adams, 1998; Adams, 2008; Doyle ve ark., 2007; Wilkie ve Whittaker, 2006).
4. Aynı yazarın aynı yıl yayınları söz konusu ise her biri "a" harfinden başlayarak küçük harflerle işaretlenmelidir; .... (Adams, 2005a; Adams, 2005b;...).

**Kaynak listesi aşağıdaki şekilde hazırlanmalıdır:**

1. **Kaynak listesi yazar soyadına göre alfabetik olarak sıralanmalıdır.**
2. **Kaynaklarda yer alacak dergi adları ISI web of Science'a göre kısaltılmalı ve italik yazılmalıdır.**
3. **Kaynakların yazın şekli aşağıdaki şekilde olmalıdır.**

**Makale;** Sullivan JC, Sasser JM, Pollock JS, 2007: Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 292 (1), 64-68.

**Kitap;** Cadenas E, Packer L, 2001: Handbook of Antioxidants. 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, USA.

**Kitaptan bir bölüm:** Bahk J, Marth EH (1990). Listeriosis and *Listeria monocytogenes* In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), 248-256, Academic Press, San Diego. **Web sayfası:** Anonim (1) <http://www.emea.europa.eu>, Erişim tarihi; 01.04.2010.

**Tez:** Er A, 2009: Makrolid grubu antibiyotiklerin endotoksemide sitokin düzeylerine etkisi. Doktora tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

**Bilimsel toplantıda sunulan bildiri:** Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN, 2006: Re-establishment of oviducal patency and fertility in infertile mares. In: Proceedings of the Ninth International Symposium on Equine Reproduction, Kerkrade, Holland, pp. 27-28.

**Tablo ve Şekiller:** Her bir tablo ve şekil ayrı sayfalara yerleştirilmelidir. Kullanım sırasına göre numaralandırılmalı, kısa başlıklarla ifade edilmeli ve metin içinde tablo numarası verilerek atıfta bulunulmalıdır. Tablo başlıkları makalenin yazım dilinde tablonun üst bölümüne yazılmalıdır. Tabloda kullanılan kısaltmalar ve gerekli açıklamalar tablo altında verilmelidir. Şekil başlıkları makalenin yazım dilinde şeklin alt bölümüne yazılmalıdır.

## HARRAN UNIVERSITY VETERINARY FACULTY JOURNAL PUBLICATION RULES \*

- 1- Journal of Harran University Veterinary Faculty is a refereed journal that publishes original clinical and experimental research in Turkish and English, covering human and animal health, especially in the field of Veterinary Science, case reports, reviews (at least 3 on the subject of compilation of the invited or responsible author) the research paper must be on the reference list), short scientific articles and letters to the editor. Publishing articles in English is given priority in the journal. The journal is published electronically every 6 months and 2 issues a year. There are no fees for published articles.
- 2- Publications accepted to the journal should not have been published elsewhere. It should not have been submitted to other journals for review simultaneously. All legal and criminal liability arising from the published articles belong to the authors. Authors are not paid the right to publish. Submitted articles and their attachments are not returned, whether the article is published or not.
- 3- The works that have been previously communicated in congresses and published with a summary are accepted to be stated on the cover page. However, if the publication is produced from the thesis and there is a supporting organization, it should be stated in the publication.
- 4- The article that reaches the Journal Editor is subjected to preliminary evaluation by the journal editor. Editing has the right to reject the article according to the preliminary evaluation result or to request correction before subjection to the reviewer.
- 5- Articles are sent to at least two referees for evaluation. In the article acceptance process, if the opinions of the two referees differ, the editor decides by taking the opinion of a third referee or advisory board.
- 6- TUBITAK ULAKBIM respect for ethical principles, which opened to the use of all universities in Turkey "iThenticate" sent through plagiarism detection program, the whole article, must be made of the case report and review of the preliminary assessment and the delivery of results. According to these preliminary evaluation results, the similarity rate of articles, case reports or reviews with other references should not exceed 15% (excluding abstract, abstract and references). Articles, case reports or reviews sent to our journal for publication will not be evaluated if the similarity rate exceeds 15% in the evaluation made through the "ithenticate" program.
- 7- At least 20% of references to any submitted article (for all article categories) must include references published in the last five years. Anonymous references should be kept to a minimum.
- 8- If the article is accepted for publication, the Copyright Transfer Agreement, which includes the declaration that any right of publication has been transferred, must be signed by all authors and sent to the journal editor before printing. Articles without Copyright Transfer Agreement are not published even if they are accepted to publish.
- 9- An article, case report, review etc. to be sent to Harran University Veterinary Faculty Journal. When the works are sent to <https://dergipark.org.tr/tr/pub/huvfd>, they are taken into the evaluation process.
- 10- An article, case report, review etc. to be sent to Harran University Veterinary Faculty Journal. Works must be saved in MS Word format, all photographs (pictures) at least 300 dpi resolution, in TIFF or JPEG format.

## WRITING RULES

Manuscripts should be prepared in MS Word format, Times New Roman font, with 12 font size, double line spacing and 2.5 cm space on each side. Line numbers (continually starting from page 2 of the article) should be added to the article. Articles of this type should not exceed 15 pages in original scientific research and reviews, including figures and tables, and 5 pages in short scientific articles and case reports.

International Standard Units (SI-system) should be used for units and dimensions.

Research Articles: Original research articles should be arranged in the order of the following main topics: Title, Author names (must be marked with the responsible author (\*)), Author addresses, Author ORCID numbers, Abstract and Keywords (3 - 6 words), English title, Abstract and Introduction to Keywords, Material and Method, Results, Discussion and Conclusion, Thanks or Information and References. Each Table and Figure should be on separate pages.

## STYLE AND FORMAT

Abstract: It should be prepared not to exceed 250 words in original research articles and 200 words in other types of articles.

Keywords: It should be given in alphabetical order below the summary in both languages, maximum 6. Keywords should be selected from Turkey Science Terms. Turkey Science Terms in the selection of keywords from the internet address (<http://www.bilimterimleri.com>) should be utilized.

Introduction: In order for the results to be understood and interpreted, information about the studies done on that subject should be included. In the introduction, the hypothesis of the study should be specified. The purpose of the study should be clearly written at the end of this section.

Material and Method: Experimental studies should be given in this section with sufficient detail that can be repeated by other researchers. When using a technique described in an article published in international indexed journals, it is necessary to describe the method very briefly and to cite the relevant original article. In the article, it should be stated in this section whether the ethical committee permission and / or legal / special permission should be obtained. In original research articles using animals as materials (clinical, experimental, field studies, etc.); ethics committee approval must have been obtained. Explanatory information including the name, number and date of the ethics committee's ethics committee approval / permit document should be written in the material and method section. The editorial board has the right to request the ethics committee approval document.

Results: Research findings should be given clearly and understandably. Findings should be supported with tables and figures when necessary and presented briefly.

Discussion and Conclusion: Findings should be discussed in the light of the literature before going into unnecessary detail and the importance of the findings should be emphasized. It should be finished with a conclusion or suggestion sentence.

Acknowledgment: Personal contribution and monetary support to the study or article should be stated here.



Compilation: These are articles that contain innovations on the subjects of the journal's publications and are prepared by using current references. If the authors have at least 3 works directly related to the subject and they can be accepted for publication. When submitting his review, the responsible author should send the imprint information of the articles related to the subject to the editor of the journal (article tags must be presented on the last page of the article text). Reviews compiled and published in Harran University Veterinary Faculty Journal are invited reviews. In the compilation; Summary, Introduction, Conclusion and References sections should be available.

Case Report: These are the works that contain information of scientific value that the authors discuss the new or rare cases that they encounter. Maximum 15 references should be used and care should be taken to keep these references up to date. Case reports; It should consist of Summary, Introduction, Case description, Discussion and Conclusion and References sections.

Short Scientific Article: In short scientific articles, it should be handled narrowly and new information and findings should be presented. It should be prepared in the form of a research paper and should not exceed 5 pages. Must contain no more than 2 tables or figures.

References:

While citing in the text;

1. The publication year of the reference should be specified in parentheses after the surname of the author or authors; By Adams (1998); By Wilkie and Whittaker (1997); Doyle et al. (2007) by....

2. When cited at the end of the sentence, the name of the author and the year of publication must be indicated in parentheses; ... have been reported (Adams, 1998); .... has been reported (Wilkie and Whittaker, 1997); ..... has been reported (Doyle et al., 2007).

3. In case of reference to more than one reference, first alphabetical and chronological order should be done;

.... reported (Adams, 1998; Adams, 2008; Doyle et al., 2007; Wilkie & Whittaker, 2006).

4. If the same author has publications in the same year, each should be marked in lowercase letters, starting with the letter "a";

.... (Adams, 2005a; Adams, 2005b;...).

The list of references should be prepared as follows:

1. Reference list should be listed alphabetically by author surname.

2. The names of the journals in the references should be shortened according to the ISI web of Science and should be written in italics.

3. Type of references should be as follows.

Journal article; Sullivan JC, Sasser JM, Pollock JS, 2007: Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 292 (1), 64-68.

Book; Cadenas E, Packer L, 2001: Handbook of Antioxidants. 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, USA.

Chapter in a book: Bahk J, Marth EH (1990). Listeriosis and *Listeria monocytogenes* In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), 248-256, Academic Press, San Diego. Web page: Anonymous (1) <http://www.emea.europa.eu>, Access date; 01.04.2010.

Thesis: Er A, 2009: Effect of macrolide antibiotics on cytokine levels in endotoxemia. PhD thesis, SU Health Sciences Institute, Konya.

Paper presented at the scientific meeting: Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN, 2006: Re-establishment of oviducal patency and fertility in infertile mares. In: Proceedings of the Ninth International Symposium on Equine Reproduction, Kerkrade, Holland, pp. 27-28.

Tables and Figures: Each table and figure should be placed on separate pages. It should be numbered according to the order of use, expressed in short titles, and should be cited by giving the table number in the text. Table titles should be written in the writing language of the article in the upper part of the table. Abbreviations and necessary explanations used in the table should be given under the table. Figure titles should be written at the bottom of the figure in the writing language of the article.

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

## TELİF HAKKI DEVİR FORMU

### Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi Editörlüğüne

Biz aşağıda adı, soyadı ve imzaları bulunan yazarlar, tarafımızdan yazılmış,

.....  
.....

İsimli makalenin içeriği, sonuçları ve yorumları konusunda, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nin hiçbir sorumluluk taşımadığını kabul ederiz. Sunduğumuz makalenin orijinal olduğunu, herhangi bir başka dergiye yayınlanmak üzere gönderilmediğini, daha önce yayınlanmadığını beyan ederiz. Makalenin telif hakkından feragat etmeyi kabul ederek sorumluluğu üstlenir ve imza ederiz. Makalenin telif hakkı Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne devredilerek yayınlanması konusunda yetkili kılınmıştır.

Bununla birlikte yazarların aşağıdaki hakları saklıdır:

1. Telif Hakkı dışında kalan patent v.b. bütün tescil edilmiş haklar.
2. Yazarın gelecekteki kitaplar ve dersler gibi çalışmalarında; makalenin tümü ya da bir bölümünü ücret ödemeksizin kullanma hakkı.
3. Makaleyi ticari amaçlarla kullanmamak koşulu ile çoğaltma hakkı.

Yazarın Adı ve Soyadı

Tarih

İmza

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**Sorumlu yazarın adı/yazışma adresi:**

.....

Telefon: ..... Fax: ..... E-mail: .....

*(Makale başvurusu ile bu formu bütün yazarlar tarafından imzalanmış olarak "<http://dergipark.gov.tr/huvfd>" adresinden yükleviniz.)*

**COPYRIGHT TRANSFER FORM**

We grant that Harran University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine has no responsibility for the content, results and conclusions of the manuscript entitled,

.....  
.....

We state that the submitted manuscript is original, has not been published or is not being considered for publishing elsewhere. We grant to disclaim the copyright and sign this form by undertaking all responsibility. Hereby Harran University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine has been authorized for publishing by transferring the copyright of the manuscript.

However the following rights of the author(s) are reserved:

1. All other rights such as patent right.
2. The rights for using the manuscript as a whole or a part in their future Works such as books or lectures without paying any charge.
3. The rights for reproducing the manuscript for purpose other than commercial use.

<u>Name and Surname of the Author</u>	<u>Date</u>	<u>Signature</u>
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....

**Address of the Corresponding Author:**

.....  
.....

Phone: ..... Fax: ..... E-mail: .....

*(Upload the form to "<http://dergipark.gov.tr/huvfd>" after filling it.)*

